

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«__» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва рекомбінантного білку р24 штамом
Escherichia coli. Дільниця біосинтезу»**

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-62

Власенко Денис Володимирович

Керівник:

Професор каф. промислової біотехнології, д.ф-м.н.

Литвинов Григорій Сергійович

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович

Рецензент:

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6203 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проекту	Лист	Листів
Розробн.	Власенко Д.В.				1	1
Керівн.	Литвинов Г.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.	Фесенко С.В.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва рекомбінантного
білку р24 штамом *Escherichia coli*. Дільниця біосинтезу»

Київ – 2020 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Власенку Денису Володимировичу

1. Тема проєкту «Технологія виробництва рекомбінантного білку р24 штамом *Escherichia coli*. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Литвинов Григорій Сергійович, д.ф-м.н., проф., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штами-продуценти *Escherichia coli* Rosetta(DE) *pLysS*; середовище культивування H15 модифіковане; ферментер для промислового культивування – об'єм 0,16 м³; параметри культивування: t = 36 °C, аерація 7л/хв, перемішування, τ = 8-12год; кінцевий продукт – заморожений розчин у флаконах.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білку; розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що

використовується у проєкті; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20-17.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20-26.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-06.05.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-18.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20-08.06.20	
6.	Охорона праці	28.04.20-03.06.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-03.06.20	
8.	Подання дипломного проєкту до екзаменаційної комісії	30.05.20-10.06.20	

Студент

Денис ВЛАСЕНКО

Керівник

Григорій ЛИТВИНОВ

РЕФЕРАТ

Дипломний проект: 114 с., 14 рис., 9 табл., 63 посилання.

Робота присвячена вдосконаленню процесів культивування, зокрема використання покращених штамів, при виробництві рекомбінантного білка p24.

Запропоновано в якості продуцента використовувати штам *E. coli Rosetta(DE3)pLysS* модифікований плазмідом *pET-15b-p24* який показує низьку вірогідність спонтанної індукції, що значно оптимізує процес біосинтезу. Розглянуто морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки обраних продуцентів, їх пробіотичні властивості.

В роботі розраховано та вибрано обладнання для культивування бактерій *E. Coli Rosetta(DE3)pLysS*. Наявний технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки виробничого ферментера. Обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

Технологія, представлена в даній роботі відповідає екологічним та санітарно-гігієнічним нормам. Вказані заходи безпеки, та охорона праці

КЛЮЧОВІ СЛОВА: РЕКОМБІНАНТНИЙ БЛОК, p24, СА, ВІРУС ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ, ВІЛ, *ESCHERICHIA COLI*, *ROSETTA (DE3) PLYSS*, *PET-15B*, ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ІНДУКЦІЯ, ПТТГ, T7-ПРОМОТОР, LAC-ОПЕРОН.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Власенко Д.В.				Д	5	110
Консульт.								
Керівник		Литвинов Г.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ABSTRACT

Diploma project: 114 pages, 14 figures, 9 tables, 63 references.

The work is devoted to the improvement of cultivation processes, in particular the composition of the nutrient medium and the use of improved strains in the production of recombinant p24 protein.

It is proposed to use a strain of *E.coli Rosetta (DE3) pLysS*, modified with plasmid *pET-15b-p24* which shows a low probability of spontaneous induction as a producer, which significantly optimizes the process of biosynthesis. Morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of selected producers, their probiotic properties are considered.

The equipment for cultivation of *E.coli Rosetta (DE3) pLysS* bacteria was calculated and selected. Technological, constructive and thermal calculations of the production fermenter are given. The technological and equipment schemes of production are substantiated and presented in the work. The technology presented in the paper meets environmental and sanitary standards. Safety measures and labor protection are indicated.

KEYWORDS: RECOMBINANT PROTEIN, p24, CA, HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS, HIV, ESCHERICHIA COLI, ROSETTA (DE3) PLYSS, PET-15B, PRODUCTION CULTIVATION, INDUCTION, IPTG, T7-PROMOTOR, LAC-OPERON.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
1. РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1.Основні промислові продуценти.....	12
1.2.Класифікація продуцента.....	15
1.3.Морфолого-цитологічні ознаки.....	15
1.4.Культуральні ознаки.....	16
1.5.Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.6.Серологічні ознаки	24
1.7.Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів.....	25
2. РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	26
2.1.Характеристика кінцевого продукту.....	26
2.2.Схема хімічних перетворень.....	28
2.3.Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	31
2.4.Методи очистки цільового продукту.....	31
2.5.Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	34
3. РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	35
3.1.Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	35
3.2.Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	38
3.3.Схема отримання продуцентів, що використовуються в роботі.....	44
4. РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	48
4.1.Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	48
4.2.Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються на виробництві.....	49

					ДП 6203. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Власенко Д.В.			ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	7	110
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Литвинов Г.С.						
Затвер.								

4.3.Опис технологічного процесу.....	60
4.4.Матеріальний баланс.....	75
4.5.Контроль виробництва.....	79
5. РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	85
5.1.Обґрунтування обраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	85
5.2.Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки.....	88
5.3.Вибір загальнозаводського обладнання.....	98
5.4.Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	99
ВИСНОВКИ.....	102
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	104

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

Вступ

Поширення вірусу імунодефіциту людини є досить актуальною проблемою українського суспільства. Україна є лідируючою країною за кількістю ВІЛ-позитивних осіб серед країн Європи. У жовтні 2015 на засіданні Координаційної ради UNAIDS було ухвалено стратегію UNAIDS 2016 – 2021 «На шляху прискорення для подолання СНІДу», яка регламентує план дій для відповіді на епідемію, щоб досягнути визначених показників у лікуванні, профілактиці і викоріненні дискримінації ВІЛ-інфікованих осіб. Україна також бере участь у процесі здолання епідемії.

На превеликий жаль, в даний час, рівень поширення ВІЛ-інфекції в Україні дуже високий. За оцінними даними Центру громадського здоров'я МОЗ України, на початок 2018р. в Україні проживало 244000 ВІЛ-позитивних осіб, і тільки кожен другий знав про свій діагноз. 1% громадян у віці від 15 до 49 років є ВІЛ-інфікованим, даний показник є одним з найвищих в Європі. Станом на 1 квітня 2019 року під медичним наглядом перебувало 142076 ВІЛ-інфікованих осіб, з них — 46987 хворих із діагнозом «СНІД» [1].

ВІЛ-інфекція – хронічна інфекційна хвороба, розвивається внаслідок інфікування вірусом імунодефіциту людини. Характеризується прогресуючим ураженням усіх клітин, що мають CD4+ рецептор (особливо імунної системи). Збудником є вірус імунодефіциту людини, який належить до підродини лентівірусів з родини ретровірусів. Вірус передається статевим шляхом, парентеральним шляхом (при використанні контамінованих ВІЛ медичних інструментів, при переливанні крові інфікованого, зареєстровані випадки зараження при трансплантації органів ВІЛ-інфікованого донора), перинатальним шляхом — від годувальниці до дитини під час грудного

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Власенко Д.В.			ВСТУП	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	9
						КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Керівник		Литвина Г.С.				ФБТ	
Затвер.							

годування (горизонтальний), від матері до дитини під час вагітності і пологів (вертикальний), описані випадки зараження матері-годувальниці від інфікованої дитини.

Часто ВІЛ-інфіковані досить довготривалий період часу не мають ніяких симптомів. Під час цього періоду інфікований навіть не підозрює про небезпеку і є потенційним джерелом розповсюдження вірусу. Хоч в цей період симптоми відсутні, вірусна реплікація продовжується, у більшості пацієнтів зменшується кількість $CD4^+$ клітин приблизно на 10% в рік [2,3].

Тому для вчасного виявлення ВІЛ інфекції та застосування антиретровірусної терапії потрібні доступні і ефективні тест системи, які зможуть діагностувати хворобу.

Виділяють 2 типи ВІЛ: ВІЛ-1 і ВІЛ-2 у яких знаходять 40-60% гомологічних послідовностей. Майже всі випадки ВІЛ-інфекції викликані ВІЛ-1. Випадки ВІЛ інфекції, викликані ВІЛ-2, дуже нечисленні і поширені переважно в Західній Африці. Тож в більшості випадків, коли говорять про ВІЛ, не вказуючи тип, то мають на увазі ВІЛ-1.

ВІЛ-інфекція не має своєї строгої клінічної картини тому, що вона представлена поряд з СНІД-асоційованих і інших інфекцій. Протікає в чотири стадії

- I-стадія — інкубаційний період (2-3 тижні — декілька років). Протікає без симптомів.
- ІА-стадія — симптоми: підвищена температура, ОРЗ подібна клініка. Збільшуються лімфовузли (1-2 місяці).
- ІБ-стадія — триває від 1 місяця до декількох років.
- ІВ-стадія — симптоми: збільшення лімфовузлів, яке зберігається декілька років. Тривалість від 2-3 тижнів до 10-15 років.
- ІІА-стадія продромальний період СНІДу.
- ІІБ-стадія — за клінічними проявами близька до поняття «СНІД-асоційований комплекс».

- ІІВ-стадія — розгорнута клініка СНІДу. Симптоми: тривала лихорадка, діарея, нічне потіння, швидка втомлюваність, депресія. З'являються бактеріальні, вірусні і грибкові враження слизових.
- ІV-стадія — термінальна. Протікає в трьох клінічних формах: онко-СНІД, нейро-СНІД, інфекто-СНІД.

Стандартний протокол серологічного тестування на ВІЛ включає в себе скринінговий імуноферментний аналіз (ІФА), позитивний результат якого підтверджується за допомогою вестерн-блоту. Вестерн-блот проводять тільки в разі неоднократного отримання позитивного результату від ІФА. Вестерн-блот дозволяє виявити антитіла до білків серцевини вірусу (p17, p24, p55), до глікопротеїнів оболонки (gp41, gp120, gp160) і до ферментів (p31, p51, p66). Позитивний результат ІФА необхідно завжди підтверджувати за допомогою вестерн-блоту[4].

Стандартний протокол серологічного тестування передбачає необхідність великої кількості тест-систем, призначених для аналізу крові на наявність антитіл до білків ВІЛ.

Актуальність цієї роботи лежить в потребі модернізації виробництва тест-систем.

В даному дипломному проєкті розглядається технологія виробництва тест-систем для визначення ВІЛ.

Висока вартість виробництва ставить питання збільшення кількості цільового продукту і зменшення втрат при виробництві. Метою роботи є вдосконалення відомої технології шляхом модернізації умов культивування продуценту рекомбінантного білку задля збільшення виходу цільового продукту і, відповідно, зменшення вартості продукту.

Щоб досягти поставленої мети, потрібно ознайомитись з морфолого-фізіологічними та культуральними особливостями продуцентів, розглянути методи отримання промислових штамів, розробити оптимальну технологію виробництва та підібрати необхідне обладнання для забезпечення оптимальних умов виробництва.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

Розділ 1. Характеристика біологічного агента

1.1 Основні промислові продуценти

В біотехнології для отримання цільового продукту використовують як еукаріотів, так і прокаріотів. Серед розмаїття організмів, які використовуються для отримання рекомбінантних білків, найбільш часто використовують бактерії *Escherichia coli* і одноклітинні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. Бактерія *E. coli* – один з найбільш вивчених організмів. Завдяки здатності швидко рости і розмножуватися на бідних поживних середовищах *E. coli* стала дуже широко використовуватися в біологічних дослідженнях. Дріжджі *S. cerevisiae* також є об'єктом зацікавлення біотехнологів частково тому, що вони є дуже зручною моделлю для вивчення еукаріот, в тому числі і людини. Також в 1996 році була визначена повна нуклеотидна послідовність всього набору хромосом *S. cerevisiae*, що ще більше підвищило цінність даного організму.

E. coli і інші прокаріоти не мають здатності модифікації білків, тому для одержання необхідних еукаріотичних білків використовували *S. cerevisiae*, клітини рослин та ссавців [5].

Таблиця 1.1.1 Порівняння перспективних систем експресії [6,7]

Продуцент	Недоліки	Переваги
I	II	III
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none">• наявність кодонів, альтернативних еукаріотичним;• низька ефективність створення дисульфідних зв'язків;	<ul style="list-style-type: none">• висока швидкість росту;• дешевизна;• контрольованість;• високий вихід цільового білка;

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА		
Розробив	Власенко Д.В.						
Консульт.							
Керівник	Литвинов Г.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	12	110
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Продовження таблиці 1.1.1

I	II	III
	<ul style="list-style-type: none"> • ймовірність порушення синтезу білків в цитоплазмі (в тому числі й бактеріальних); 	<ul style="list-style-type: none"> • можливість до оптимізації експресії шляхом зміни великої кількості параметрів; • простота протоколів трансформації; • є детально вивченою, як наслідок — більш прогнозована;
	<ul style="list-style-type: none"> • слабкі посттрансляційні модифікації; • неефективність рефолдингу in vitro; 	<ul style="list-style-type: none"> • можливі досить високі рівні експресії; • велика кількість створених технологій для модифікації і контролю клітини; • простота умов культивування;
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • наявність тенденції до гіперглікозилування білків; • відмінність в глікозилуванні відносно клітин вищих еукаріотів. • алергенність багатьох N-гліканових структур; • менш досліджена, ніж <i>E. coli</i>; • вірогідно нижча секреція, ніж в <i>Pichia pastoris</i>; 	<ul style="list-style-type: none"> • висока ефективність укладання білків; • ефективна секреція білка, що дозволяє просту очистку; • наявність вибору між внутрішньоклітинною та секретованою експресією; • відносна дешевизна; • контрольованість; • наявність можливостей для виконання більшості еукаріотичних посттрансляційних модифікацій;

Продовження таблиці 1.1.1

I	II	III
<i>Клітини ссавців</i>	<ul style="list-style-type: none"> • висока вартість культивування; • складність при масштабуванні; • складність в дотриманні умов культивування; 	<ul style="list-style-type: none"> • висока ефективність укладання білків; • досить високі рівні експресії; • наявність можливостей для виконання всіх еукаріотичних посттрансляційних модифікацій; • відсутність ендотоксинів;
	<ul style="list-style-type: none"> • необхідне дотримання вимог вірусної безпеки; 	<ul style="list-style-type: none"> • підходить для секретованих білків; • висока ступінь чистоти цільового білка; • зручні для досліджень клітини;
<i>Pichia pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> • відмінність в глікозилюванні відносно клітин вищих еукаріотів; • використання легкозаймистої рідини в якості індуктора; 	<ul style="list-style-type: none"> • відносна дешевизна; • висока ефективність укладання білків; • досить високі рівні експресії; • наявність можливостей для виконання багатьох посттрансляційних модифікацій; • наявність вибору між внутрішньоклітинною та секретованою експресією; • простота умов культивування.

Відсутність можливості передбачити, яка з експресивних систем вплине на вихід білка є дуже значущою проблемою. На жаль, універсальної системи експресії на даний момент не існує. Саме тому при виборі експресивної системи необхідно зважувати переваги й недоліки даної системи, зважати на особливості цільового білка, за можливості порівняти декілька доступних варіантів систем експресії [8].

Розглянувши переваги і недоліки декількох перспективних систем експресії та порівнявши їх між собою можемо обрати найбільш оптимальну.

Білок *p24* є білком капсиду ВІЛ, тому для його отримання можна успішно використовувати прокаріотичні організми. Не зважаючи на наявні недоліки, в зв'язку з численними перевагами, які описані вище, в даній роботі запропоновано використання *E. coli*, як продуцента цільового продукту.

1.2 Класифікація продуцента

Обраний продуцент *E. coli* входить до 5-тої групи 1-шої підгрупи за визначником Берджи.

Таблиця 1.2.1 Біологічна класифікація *E.coli*

Домен:	<i>Bacteria</i> (Бактерії)
Відділ:	<i>Proteobacteria</i> (протеобактерії)
Клас:	<i>Gamma Proteobacteria</i> (Гамма-протеобактерії)
Порядок:	<i>Enterobacteriales</i>
Родина:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Рід :	<i>Escherichia</i>
Вид:	<i>Escherichia coli</i> (Кишкова паличка)

Бактерії роду *Escherichia* – це поодинокі або попарні прямі палички розміром 1,15 x 2,0-6,0 мкм. Факультативні анаероби. Аспорогенні. Існують як сапрофітні, так і патогенні представники. Деякі рухаються за рахунок перетрихіальних джгутиків або ж є зовсім нерухомими. Оптимальна температура життєдіяльності 37 °С. Дані бактерії є грамнегативними, оксидазонегативними, каталазопозитивними, цитранегативними, негативними за ознаками утворення H_2S_2 , активності ліпази і гідролізу сечовини. Для багатьох штамів характерні капсули або мікрокапсули [9].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

В даній роботі як продуцент для отримання цільового продукту використовують *E. coli* *Rosetta (DE3) pLys*, який містить рекомбінантну плазмиду *pET-15b-p24*.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

E. coli — грамнегативні палички розміром 1-3 x 0,5-0,8 мкм із заокругленими кінцями. Об'єм клітини в середньому складає 0,6-0,8 мкм³. За типом дихання — факультативні анаероби. Здатні до розвитку в діапазоні температур 10-45 °С, але оптимальною температурою є 37 °С. Оптимальне значення рН 7,2-7,5. Відсутня потреба в додаткових факторах росту [10,11].

Невелика кількість штамів має джгутики, що розташовуються перитрихіально. Джгутики являють собою вигнуті, тонкі, жорсткі структури з діаметром 10-20 нм. Певні штами здатні утворювати мікрокапсули; мають пілі [12].

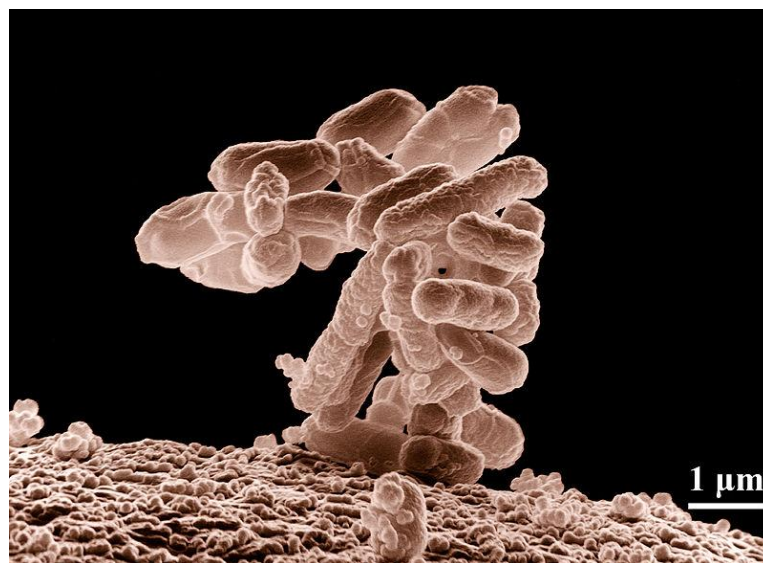


Рисунок 1.3.1 Низькотемпературний електронний мікроснімок кластера бактерій *E. coli*. Кратність збільшення x10 000 [13].

1.4 Культуральні ознаки

Бактерії *E. coli* здатні до поділу навіть на бідних поживних середовищах. Цей мікроорганізм може рости у середовищі, яке з органічних речовин містить лише глюкозу. Для дикого типу глюкоза є єдиним фактором росту і може трансформуватися метаболічним шляхом на необхідні макромолекулярні компоненти. Збагачення поживного середовища та дотримання оптимальних умов культивування значно зменшують час поділу та підвищують вихід цільового білка [14].

При рості на щільних поживних середовищах бактерії створюють каламутні, плоскі сухі R-колонії з шорсткою поверхнею і нерівними краями,

або опуклі, круглі, блискучі, напівпрозорі S-колонії з рівними або трохи хвилястими краями радіусом 1,5-2,5мм.

При рості на МПА утворюють округлі колонії молочного кольору з блискучою поверхнею і рівним краєм. Розмір колоній 2-3мм в діаметрі.

При рості на МПБ утворюють пристінкове кільце. Утворюють сіруватий осад, що легко розбивається, викликають рівномірне помутніння середовища[15].

При рості на діагностичних середовищах представники *E. coli* здатні активно розщеплювати лактозу з подальшим запасанням кислоти, як наслідок — змінюється колір індикатора, тому колонії мають яскравий колір :

- на середовищі Ендо – плоскі колонії червоного кольору з темним металевим блиском і без нього;

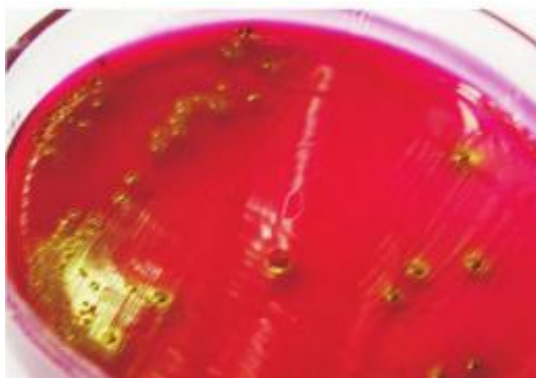


Рисунок 1.4.1 Колонії *E. coli* на середовищі Ендо [16]

- на середовищі Плоскірева – безбарвні або червоні з жовтим відтінком;
- на середовищі Левіна (ЕМС) – забарвлюються в темно-фіолетовий колір;



Рисунок 1.4.2 Колонії *E. coli* на середовищі Левіна[16]

- на кров'яному агарі є ймовірність повного гемолізу (залежить від штаму);

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

- на середовищі Хісса можуть утворювати газ [16].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

E. coli є дуже невибагливим мікроорганізмом. Глюкоза є основним джерелом вуглецю. Цей мікроорганізм метаболізує глюкозу і отримує вуглець, необхідний для пластичного метаболізму. Система метаболізму використовує 3 щаблі розкладу глюкози: шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса, цитратний цикл, фосфоглюконатний шлях. Так як *E. coli* є факультативним анаеробом, то він може з отриманого в результаті гліколізу пірувату отримувати АТФ шляхом ферментації. Збагачення поживного середовища та дотримання оптимальних умов культивування значно зменшують час поділу так підвищують вихід цільового білка [9, 17].

За типом живлення даний мікроорганізм — гетеротроф. Даний організм по відношенню до кисню є факультативним анаеробом. При посіві на вуглеводне середовище спочатку розвивається як анаеробний організм (використовує бродіння для отримання енергії). Через певний час споживає кисень для окислення продуктів бродіння, і розвивається як аеробний організм. При промисловому культивуванні, зазвичай, культуру забезпечують достатньою концентрацією розчинного кисню у середовищі для аеробного шляху отримання енергії культурою, так як вихід цільового продукту в такому разі вищий [18].

Елективні поживні середовища забезпечують переважний розвиток певного організму. Зазвичай, використовуються на початкових етапах виділення чистої культури. Аналізуючи склад селективних середовищ, таких, як середовище Левіна, середовище Кесслера, можемо помітити, які з компонентів пригнічують інші мікроорганізми або ж підтримують ріст *E. coli*. В даному випадку це лактоза і жовчні кислоти. Можемо припустити, що елективним для *E. coli* буде бідне поживне середовище, в яке буде додано лактозу і жовчні кислоти. Також в якості елективних для нашого трансформованого штаму середовищ можна використовувати середовища

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

(що використовують для промислового культивування) з додаванням відповідного антибіотика.

Основний якісно-кількісний склад поживних середовищ, як правило, розробляється з урахуванням хімічного складу мікробної біомаси.

Таблиця 1.5.1 Приблизний елементний склад клітини *E. coli* [19]

№ п/п	Елемент	% від сухої речовини	№ п/п	Елемент	% від сухої речовини
1.	Карбон	50	7.	Калій	1
2.	Оксиген	20	8.	Натрій	1
3.	Нітроген	14	9.	Кальцій	0,5
4.	Водень	8	10.	Магній	0,5
5.	Фосфор	3	11.	Хлор	0,5
6.	Сульфур	1	12.	Ферум	0,2
			13.	Інші елементи	~0,3

Клітини *E. coli* не потребують складних поживних середовищ. Середовище повинно містити, джерело вуглецю (зазвичай глюкоза або гліцерин), іони NH_4^+ , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , Na^+ , K^+ , Mg^+ , Cl^- і мікроелементи. Для збільшення швидкості поділу і підвищення виходу цільового продукту необхідно додати джерело азоту, вітаміни і т.д. Популярними середовищами для промислового культивування є LB (середовище Luna-Bertam): 0,5% дріжджового екстракту, 1,5% триптон, 0,5% NaCl; середовище №3: 2,4% дріжджового екстракту, 1,2% триптон, 0,5% глюкози, 0,0195% MgSO_4 ; середовище ТВ: 10% дріжджового екстракту, 10% пептон, 0,94% K_2HPO_4 , 0,22% KH_2PO_4 , 0,8% гліцерину [7, 20].

Клітина *E. coli* є типовою за хімічним складом клітиною прокаріотів. Клітина містить 10 — 30% сухих речовин до складу яких входять білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти полісахариди і т.д.

Таблиця 1.5.2 Хімічний склад клітини *E. coli*, вирощеної в умовах аерації на синтетичному середовищі з глюкозою при 37 °С

Складова	% від сухих речовин	Сума молекул в клітині	Кількість різних видів молекул в клітині
Протеїни	55,0	2350000	1850
РНК	20,5	-	-
23S рРНК	-	18700	1
16S рРНК	-	18700	1
5S рРНК	-	18700	1
тРНК	-	198000	60
мРНК	-	1380	600
ДНК	3,1	2	1
Ліпіди	9,1	22000000	
Ліпополісахариди	3,4	1430000	1
Муреїн	2,5	1	1
Глікоген	2,5	4300	1
Поліаміни	0,4	6700000	2
Метаболіти, іони кофактори	3,5	-	800

Як було уже згадано *E. coli* відноситься до грамнегативних бактерій. Клітинна стінка в таких мікроорганізмів багат шарова, товщиною 14-17 нм. Внутрішній шар клітинної стінки на 1-10% до сухої маси складається з пептидоглікану, у *E. coli* він дуже тонкий і може бути лише одношаровим. Полісахаридний остов складається з залишків N-ацетилглюкозаміна і N-ацетилмурамової кислоти зв'язаних β -1,4-глікозидними зв'язками. До N-ацетилмурамової кислоти приєднаний короткий пептидний хвіст, що в свою чергу складається з послідовно з'єднаних залишку молочної кислоти, L-

аланіну, D-глутамінової кислоти, мезо-Діамінопімелінової кислоти та D-аланіну.

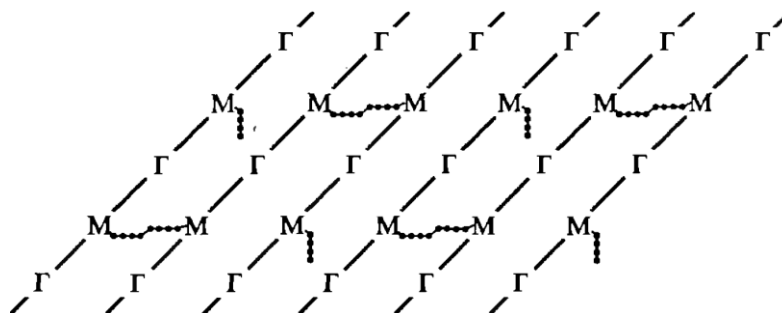


Рисунок 1.5.1 Одношарова структура пептидоглікану *E. coli*. Лініями позначено гетерополімерні ланцюги. Залишок N-ацетилмурамової кислоти (М). Залишок N-ацетилглюкозаміна(Г). Крапками позначені пептидні хвости [21].

Зовнішній шар складається з фосфоліпідів, ліпопротеїну і ліпосахариду. Специфічним компонентом зовнішньої мембрани є ліпосахарид, що складається з ліпиду А, розгалудженого цукрового ланцюга та О-антигену. В *E. coli* пептидоглікан відноситься до типу А.

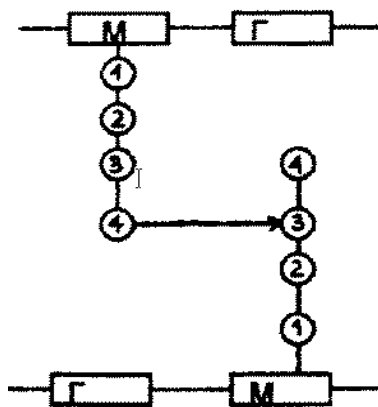


Рисунок 1.5.2 Будова пептидоглікану типу А. Залишок N-ацетилмурамової кислоти (М). Залишок N-ацетилглюкозаміна(Г). 1,2,3,4 — тетрапептид.

Ліпопротеїн містить 15 амінокислот з різною повторюваністю (всього 58 амінокислотних залишків), серед яких не знайдено пролін, гліцин, гістидин триптофан і фенілаланін. Він являє собою блокову структуру, на кінці якої знаходиться гліцерил-цистеїн, естерифікований залишками жирних кислот.

Білки зовнішньої мембрани поділяють на мажорні (omp-протеїни) і міnorні. Мажорні білки поділяють за кодуєчими структурними генами на: omp-A, omp-C, omp-F, і omp-H:1°; вони займають близько 80% всіх білків зовнішньої мембрани. Ці білки виконують різні функції: omp-A виступає місцем взаємодії з F-пілями при кон'югації; omp-C і omp-F в комплексі з пептидогліканом формують пори; omp-H:1° бере участь у йонній взаємодії з середовищем існування. Міnorні білки найчастіше задіяні в транспорті специфічних молекул через зовнішній шар. Іноді виступають рецепторами для деяких бактеріоцинів. Клітинна стінка містить багато ферментів таких як аспаргіназа, фосфатаза, ендонуклеаза і ін. [22].

Однією з особливостей будови клітинної стінки грамнегативних бактерій є відсутність в складі тейхоевих кислот.

Компоненти клітинної стінки чітко розділені електронно прозорим шаром, а також відділені периплазмою від цитоплазматичної мембрани (ЦПМ). Периплазма містить протеази, нуклеази, периферійні білки ЦПМ, рестриктази і перміази. ЦПМ являє собою білково-ліпідний комплекс. На долю білків приходить 50-75% (близько 120 різноманітних білків) і 15-50% на долю ліпідів, на долю вуглеводів — менше 20%. Головним ліпідним компонентом мембрани є фосфоліпіди [21].

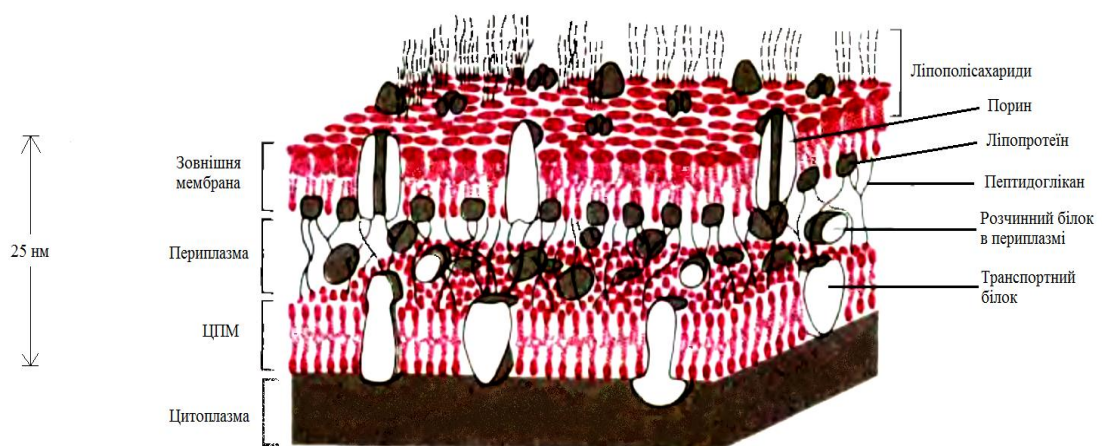


Рисунок 1.5.3 Схематичне зображення ділянки подвійної мембрани бактерії *E.coli* [23]

ЦПМ огортає цитоплазму, яка містить в собі рибосоми, внутрішньо цитоплазматичні включення, мембранні структури, набір розчинних РНК, ферментних білків, продуктів і субстратів метаболічних реакцій і т.д. Ядро і інші складні органели в цій бактерії відсутні.

E. coli розмножується бінарним поділом (нестатеве розмноження). На місці поділу спостерігається викривлення ЦПМ і клітинної стінки, що постійно збільшується. Ріст мембран і клітинної стінки відбувається в області полюсів. Час поділу при сприятливих умовах складає 20-25хв [24].

E. coli — чутливий до антибіотиків організм, здатен набувати резистентність. Ця особливість широко використовується в біотехнології та генній інженерії. Набуття стійкості завжди зумовлено або ж набуттям нової генетичної інформації, або зміною рівня експресії деяких генів.

Формування резистентності може бути обумовлено різними механізмами. В цілому можна виділити шість біохімічних механізмів формування лікарської стійкості в бактеріальній клітині:

1. Зниження проникності клітинної стінки для препарата
2. Ферментативна інактивація препарата
3. Інактивація препарата, що активує антибіотик
4. Модифікація мішені препарата
5. Підвищена експресія білка-мішені лікарського препарата
6. Підсилене виведення препарата з бактеріальної клітини.

Факторами стійкості також можуть бути:

- Інтеграція позаклітинної (чужорідної) ДНК і її рекомбінація з гомологічними генами *M. tuberculosis* з утворенням гетеродуплекса.
- Перенос в процесі кон'югації із однієї бактеріальної клітини в іншу екстрахромосомної кільцевої ДНК – R-плазміді, що містить фактор переносу стійкості (resistance transfer factor) і детермінанту стійкості.

57,0% штамів *E. coli* виявляють стійкість до ампіциліну; 42,4% - до ципрофлоксацину і моксифлоксацину; 37,1% - до цефалоспоринів III

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

покоління і 34,4% до цефалоспоринів IV покоління [25]. Наявність плазмід у обраному штамі обумовлює стійкість до ампіциліну.

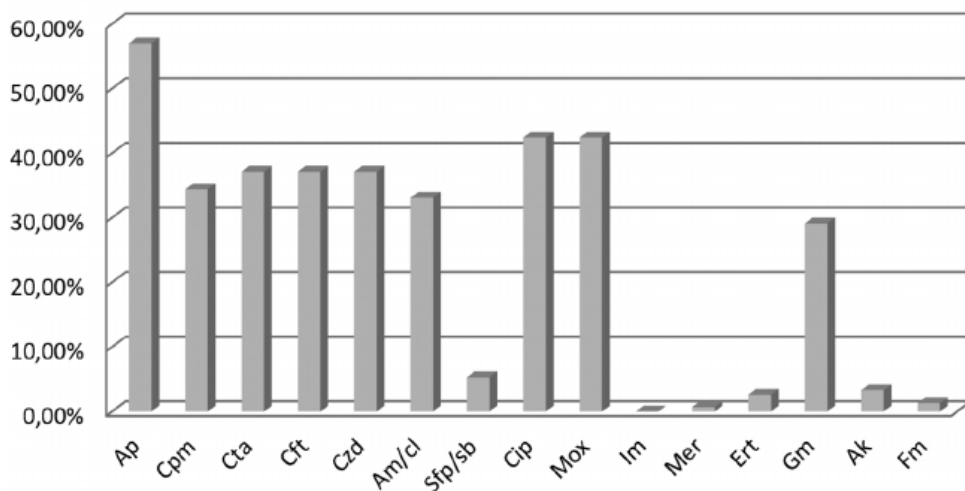


Рисунок 1.5.4 Стійкість *E. coli* до антимікробних препаратів.

1.6 Серологічні ознаки

E. coli Має складну антигенну структуру. Близько 171 серогруп визначаються соматичним О-антигеном. О-антигени мають ідентичну хімічну структуру і являють собою ліпополісахаридо-білкові комплекси клітинної стінки. Білковий компонент обумовлює імуногенні властивості: ліпідний — токсичну, полісахаридний — серологічну.

К-антиген (капсульний) має більш ніж 97 різновидів по В-антигену. Є мукополісахаридами. Можна умовно розділити за чутливістю до температури на 3 групи. А-група — термостабільна. В- і L- група — термолабільні. К-антигени розміщені на поверхні клітин. Одним з видів є К-1-антиген, який пригнічує фагоцитоз. Він є гомологом сілової кислоти. К-антигени можуть маскувати О-антигени.

Н-антигени (білок флагелін) виявлені тільки у джгутикових форм. Відомо більш ніж 57 сероварів детермінованих Н-антигеном.

Кількість можливих комбінацій О- К- і Н- антигенів перевищує 2000. Формула антигенної структури містить в собі позначення серогрупи і серовара, наприклад O101:K5:H10 [16, 26].

1.7 Поширення в природі

Розрізняють патогенні і умовно-патогенні *E. coli* в залежності від патогенності. Ця бактерія входить до складу мікробіому товстого кишечника. Вона відіграє важливу роль в регулюванні життєдіяльності макроорганізму. Є продуцентом низькомолекулярних пептидів, антагоністичні (мікроцини, коліцини), вітаміни та ін. Вміст *E. coli* в 1г калу сягає 10^9 клітин. Найбільш важливим штамом *E. coli* в кишечнику є *E. coli* M17. Цей штам входить до складу ряду препаратів, які призначають для лікування дизбактеріозу, адже зменшення вмісту кишкової палички може призвести до нього. При потрапленні в незвичні місця макроорганізму, може викликати запалення.

Патогенні *E. coli* поділяють на групи:

- ЕТКП — збудники холероподібних захворювань. Ентеротоксигенні *E. coli*.
- ЕІКП — збудники дизентерієподібних захворювань. Ентероінвазивні *E. coli*.
- ЕПКП — збудники геморагічного коліту. Ентерогеморагічні *E. coli*.
- ЕАКП — уражують епітелій дією токсинів. Ентероагрегативні *E. coli*.
- ЕДПКП — викликають руйнацію клітин епітелію у дітей з порушенням імунітету. Дифузоадгезуючі *E. coli*.

Також коліформи у великих кількостях мешкають в стічних водах, і стоках з територій ферм. Підвищений вміст коліформ у воді свідчить про фекальне забруднення [16].

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

Розділ 2. Біохімічні основи виробництва

2.1 Характеристика кінцевого продукту.

Кінцевим продуктом є білок p24, що входить до складу капсиду ВІЛ. Він широко використовується для виробництва антитіл, для перевірки тест систем, що містять антитіла до нього, для виробництва тест-систем для визначення антитіл до даного антигену в крові людини.

Три гени: *gag*, *pol* і *env* визначають самовідтворення більшості ретровірусів.

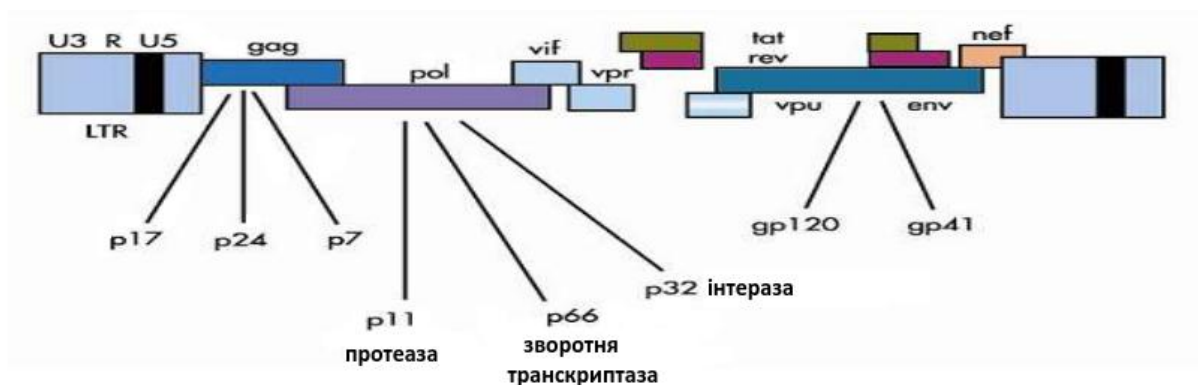


Рис. 2.1.1 Геном ВІЛ

Для ретровірусів класична схема геному записується як *5'LTR-gag-pol-env-LTR3'* [26].

Цільовий білок кодується *gag* геном. *Gag* кодує міристильований білок попередник p55 який дією вірусної протеази розщеплюється на:

- p17 (MAtrix); функції: закріплення на мембрані, взаємодія з env, клітинний транспорт до вірусного ядра (міристильований білок);
- p24 (CApsid); функції: утворення оболонки капсиду вірусу;
- p7 (NucleoCapsid); функції: створення комплексу з вірусною РНК, є складовою частиною віріону;
- p6; функції: пов'язує Vpr[27].

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив	Власенко Д.В.				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	26
Керівник	Литвина Г.С.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							
						Аркушів	110

Приблизно 1500 мономерів р24 утворюють капсид. Серед цих мономерів переважна більшість має форму гексамера, невелика кількість мають форму пентамера і згладжують кривизну в верхній і нижній частинах капсиду, щоб утворити замкнуту структуру.

Сам білок СА містить 2 домени: N-кінцевий домен (CA_{NTD}) ~150 амінокислотних залишків і С-кінцевий домен (CA_{CTD}) ~ 80 амінокислотних залишків. CA_{NTD} складається з п'яти довгих та двох коротких спіралей. Довгі спіралі утворюють подібну до котушки структуру. Неполарні грані спіралей утворюють внутрішню частину суперспіралі і забезпечують гідрофобну взаємодію між собою, що в свою чергу забезпечує стабільність пента- або гексамерної структури [28, 29].

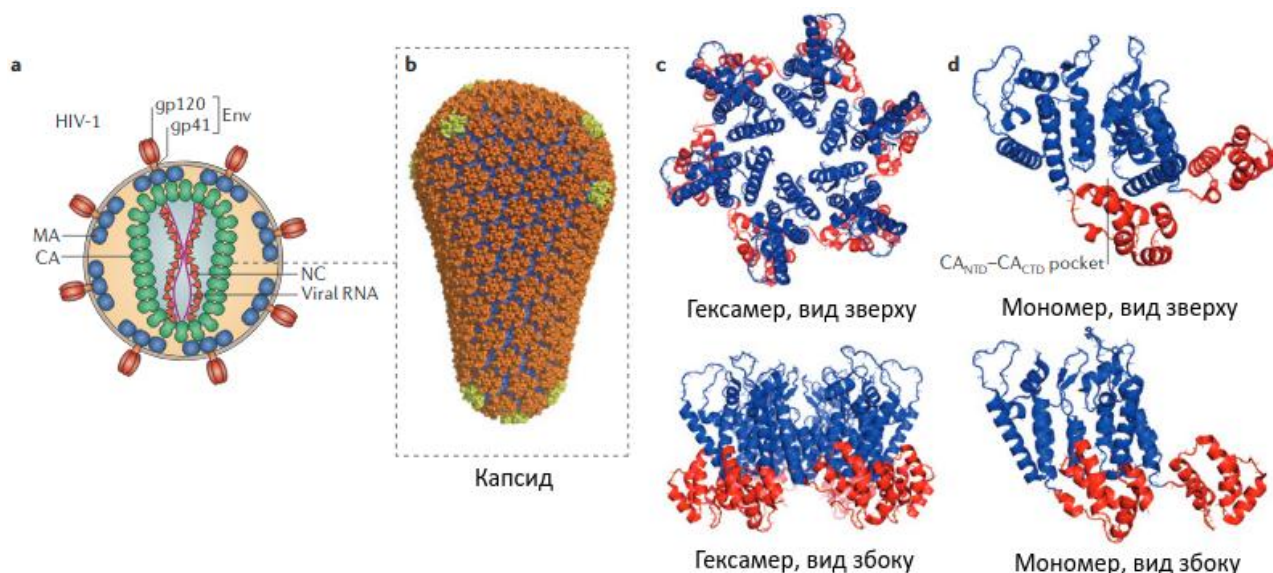


Рис. 2.1.2 Структура капсиду ВІЛ: а) Схематичне зображення зрілого віріона ВІЛ-1, що зображує вірусну глікопротеїнову оболонку Env, яка складається з глікопротеїну gp120 та gp41, матричний білок (МА), капсидний білок (СА) і нуклеокапсидний білок (NC). Конічний капсид зібраний з гексамерів та пентамерів СА. Капсид містить вірусний РНК-геном, який асоціюється з NC. б) Конічний капсид збирається у фулереновий конус, що містить гексамерні (помаранчеві) та пентамерні (жовті) субодиниці СА. с) Вид зверху і вид збоку гексамерних субодиниць, які утворюють основне капсидне ядро ВІЛ-1. Взаємодія між аміно-термінальним доменом СА (CA_{NTD} ; синій) та карбокси-термінальним доменом СА (CA_{CTD} ; червоний) сусідніх мономерів

стабілізує зібраний гексамер. d) Структура двох мономерів СА гексамера, що ілюструє стик CA_{NTD} – CA_{CTD} , який опосередковує взаємодію між СА та білками клітини-господаря [29].

Коли СА утворюють пента або гексамери, то CA_{NTD} опиняється на зовнішній поверхні капсиду, а CA_{CTD} — на внутрішній. Контакти CA_{NTD} – CA_{CTD} між сусідніми мономерами СА додатково стабілізують гексамерні або пентамерні субодиниці. Цей стик CA_{NTD} – CA_{CTD} утворює сайт зв'язування з численними клітинними факторами, які грають роль у зараженні. Більші збірки гексамерів та пентамерів утримуються разом гідрофобними залишками в CA_{CTD} , які служать основою для зрілого капсиду [29, 30].

2.2 Схема хімічних перетворень

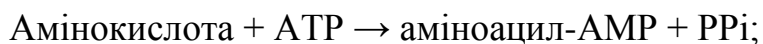
Біосинтез білка складний і багатостадійний процес. Здійснюється на рибосомах, яких у клітині *E. Coli* близько 20 000.

Біосинтез білка відбувається в декілька етапів:

- Транскрипція — процес синтезу мРНК на матриці ДНК. Процес відбувається в цитоплазмі за участю РНК-полімерази зі швидкістю 40 нукл/с. Продуктом є зріла РНК розмірами від 1000-1500 до 10-15 т.н.
- Трансляція — процес синтезу білка на матриці мРНК.

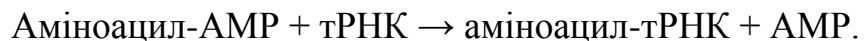
Так як у *E. coli* ДНК не відокремлена від цитоплазми мембраною, то транскрипція і трансляція відбувається майже одночасно. Ще до завершення транскрипції до мРНК приєднуються рибосоми, які, просуваючись по ланцюгу мРНК, здійснюють паралельний синтез білка. Процес трансляції умовно поділяється на 4 фази:

1. Активація амінокислот. Суть полягає у утворенні кон'югату амінокислоти з певною тРНК під дією аміноацил-тРНК-синтетази (АРСази). Механізм аміноацетилювання є двостадійним, його можна показати у вигляді двох рівнянь:



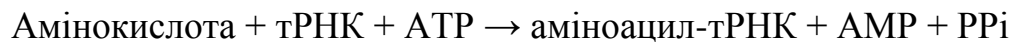
Дві фосфатні групи (PPi) відщеплюються, утворюючи пірофосфат, від АТР на їх місце приєднується амінокислота. Утворюється аміноацил-аденілат.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28



З активним центром АПСазид зв'язується 3'-кінець тРНК, антикодон якої відповідає амінокислоті, за яку відповідає АРСаза. Амінокислотний залишок переноситься на 2'- або 3'-ОН групу рибози останнього аденіну тРНК на 3'-АСС-кінці. Як результат — утворена аміноацил-тРНК.

Сумарне рівняння обох реакцій:



2. Ініціація біосинтезу білка. Спочатку відбувається з'єднання вільної 30S субодиниці з білковими факторами ініціації IF1, IF2 і IF3. Далі комплекс 30-S-субодиниці з факторами ініціації зв'язується з мРНК в ділянці зв'язування рибосоми. Потім ініціаторна тРНК приєднує метіонін, а ферментна система формілює NH₂-групу залишку метіоніну, в результаті чого утворюється fMet-тРНК. Після виходу факторів ініціації IF1 і IF3 до комплексу приєднується велика 50S-субодиниця рибосоми. Відбувається зміна конформації рибосоми, під час якої відбувається звільнення з комплексу фактора IF2. Формілметіонін -тРНК разом з AUG-кодоном залишають акцепторний сайт і переходять в донорну ділянку. Ініціаційний комплекс, який включає в себе 70S рибосому, мРНК та ініціаторну тРНК стає готовим для наступної стадії.

3. Елонгація поліпептидних ланцюгів. Перший цикл елонгації починається, коли fMet-тРНК зв'язується з Р-ділянкою рибосоми. Зв'язування полегшується фактором елонгації *Tu* (*EF-Tu*) з GTP. В сайт А надходить нова, комплементарно відповідна аміноацил-тРНК. GTP гідролізує, відбувається вивільнення *EF-Tu-GDP*. Після чого відбувається від'єднання формілметіонін від ініціаторної тРНК на Р ділянці і перенесення його на А ділянку рибосоми. При цьому утворюється пептидний зв'язок між карбоксильною групою формілметіоніну і аміногрупою наступного залишку амінокислоти. Пептид, що утворився, з'єднаний з залишком тРНК, що знаходиться на А сайті. В кінці циклу рибосома просувається на 3 нуклеотиди в напрямку 3'кінця мРНК за рахунок переходу пептидил-тРНК з

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

А ділянки в Р ділянку рибосоми. Ця підстадія називається транслокацією. Після завершення транслокації вивільняється EF-G фактор з елонгуючого комплексу, залишаючи А-сайт вільним. Далі починається наступний цикл. В прокаріотів рибосома здійснює до 20 циклів за секунду.

4. Термінація та реініціація синтезу білків.

Фактори термінації RF1 і RF2 беруть участь в розпізнаванні термінуючих кодонів. RF3 — імітує структурні особливості *EF-Tu* фактора, але так як він не пов'язаний з аміноацил-тРНК, то його поява на сайті А призводить до обриву ланцюга поліпептиду. Після чого також звільняються фактори RF1 і RF2 (в кінці процесу термінації). Вище зазначені фактори відповідають за дисоціацію комплексу, компоненти якого беруть участь в інших циклах біосинтезу. Функція фактору RF4 не досліджена повністю, припускають що цей фактор видаляє решту RF факторів з А сайту. Відокремлена рибосома дисоціює на 50S і 30S субодиниці [31, 32].

Після або під час синтезу поліпептидного ланцюга, білок формується у тривимірну структуру. Так як наш цільовий білок не бере участі в клітинних процесах *E. coli*, то він накопичується в клітині у вигляді тілець-включень. Так як білкові утворення знаходяться в біологічно неактивному стані, подальший технологічний процес повинен містити руйнацію клітин, відмивання тілець-включень, розчинення тілець-включень та рефолдинг [7].

На даний момент відсутнє універсальне рішення, яке б дозволило отримувати рекомбінантні білки в нативній формі. Для збільшення відсотку виходу білка в розчинній формі оптимізують такі параметри культивування, як: температура (знижують), тривалість, концентрація індуктора (ШТГ), склад поживного середовища. Розробляються вектори для оптимізації експресії [33].

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевим продуктом — рекомбінантний білок p24 ВІЛ, очищений хроматографічним методом, який зберігається в розчині DPBS (pH 7,4) за температури від -20 до -80 °С.

Склад буфера (в розрахунку на 1 л):

- NaCl (136,9мМ) 8,00г
- KCl (2,67мМ) 0,20г
- Na₂HPO₄ (8,1мМ) 1,15г
- KH₂PO₄ (1,47мМ) 0,20г

Буферний розчин за допомогою NaOH (5%) доводять до pH 7,4. Розчин фільтрують через нейлоновий фільтр з діаметром пор – 0,22 мкм.

Чистота препарату > 95% (за результатами ДСН-електрофорезу).

Кінцева концентрація білка – 1 мг/мл [34, 35].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Найбільш загальна стратегія, яка використовується для ренатурації нерозчинних білків включає в себе три етапи:

- 1) ізоляція і очистка тілець-включень;
- 2) солюбілізація агрегованого білка;
- 3) рефолдинг і очистка солюбілізованого білка.

Не дивлячись на високу ефективність проходження перших двох етапів ренатурації, лімітуючою є стадія рефолдингу, це пов'язано з вірогідністю утворення неактивних форм або ж високомолекулярних агрегатів при переході білка в нативну форму.

Підбір умов очистки і рефолдингу агрегованих білків здійснюється емпіричним шляхом і унікальні рекомбінантні білки *E. coli* потребують

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

розробки унікальних протоколів для переведення їх в нативну форму з високим виходом [36].

Для ізоляції і очистки тілець-включень білка p24 отриману біомасу гомогенізують та суспензують в буферному-розчині для лізису наступного складу[37] :

- 100 mM Tris-HCl (pH 8);
- 100 mM NaCl;
- 1.0 mM PMSF (фенілметилсульфоніл);
- 50 мг/мл лізоциму

Отриману суспензію піддають впливу перепаду температур (заморозці-розморозці) та впливу ультразвуку. Піддають впливу ДНКаз. Описані дії необхідні для руйнації клітинних стінок та генетичного матеріалу. Нерозчинні тілець-включення осаджують центрифугуванням ($14000 \times g$ протягом 20 хв при 4°C).

Для відмивки цільового білка від компонентів клітин, що піддалися руйнації. Відмивку проводять методом ресуспендування і гомогенізації супернатанту в розчині для відмивки та повторному центрифугуванні. Цю процедуру повторюють декілька разів.

Буферний розчин для відмивки (pH 8,0):

- 4М карбамід
- 50мМ Tris-HCl
- 1 мМ EDTA

Відмиті тілець-включення переводять в розчинний стан, вносячи супернатант в розчин В, що містить високу концентрацію карбаміду який є сильним денатуруючим агентом. Дуже важливо використовувати свіжоприготований розчин карбаміду, так як при підвищеній температурі і підвищеному значенні pH утворюються ціанат-йони, які здатні ковалентно модифікувати аміногрупи білка. Застосування SDS і інших йонних детергентів обмежено складністю їх видалення на наступних етапах очистки.

Склад буферного розчину В (pH 8,0)[38]:

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- 8 М карбамід;
- 50 мМ Tris-HCl;
- 10 мМ реагент Келланда;
- 1 мМ EDTA.

Промивка тілець-включень детергентами не забезпечує достатній ступінь очистки від супутніх домішок. Наявність домішок може викликати агрегацію рекомбінантних білків при проходженні рефолдингу. Небілкові домішки не дуже впливають на процес рефолдингу, а от білкові — можуть значно знизити вихід цільового продукту [36].

Для очистки солюбілізованих рекомбінантних білків широко використовують хроматографічні методи. Ці методи очистки є дуже надійними та ефективними. В промислових цілях, зазвичай, використовують іонообмінну, зворотньофазну хроматографію, а також гель-фільтрацію. Перевагою цих методів є можливість проводити очистку в умовах, за яких солюбілізований білок знаходиться в денатурованому стані і не утворює агрегатів. На першому етапі можна використати Q-Sepharose, яка являє собою сильний аніонообмінник. Складається із зшитих 6% агарозних кульок з сильними аніонообмінними амонійними групами. Елюцію проводять розчином NaCl з концентрацією 0,2-0,25М. Ступінь чистоти білку після елюції становить > 80%. Для підвищення ступеню чистоти використовують аніонообмінну хроматографічну смолу MonoBeads Q, очищення, на якій дає ступінь чистоти > 95%. Для остаточної очистки і рефолдингу використовують гель-фільтрацію. Очищений білок переводять в буферний розчин PBS, тим самим зменшуючи концентрацію денатуруючого агенту [39, 40].

Зразок очищеного цільового білка підлягає перевірці електрофорезом на поліакриламідному гелі.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

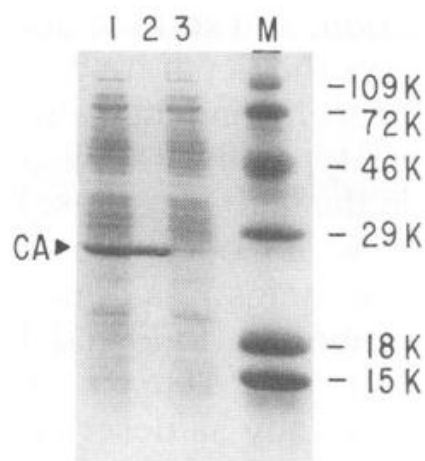


Рис 2.4.1 Виділення рекомбінантних білків CA (p24) з *E. coli*. Зображено пофарбований в кумассі бриліантовий синій SDS поліакриламідний гель: смуга 1 — білки у незв’язаній фракції, смуга 2 — очищений білок, смуга 3 — білки, що лишилися в суспензії після виділення CA [41].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Капсид ВІЛ, до складу якого входить р24, бере участь у різних стадіях циклу вірусної реплікації. Під час утворення вірусу р24 утворює гексамерні та пентамерні структури, які збираються в капсид, оточуючи вірусний РНК геном. Також р24 відіграє ключову роль в ряді процесів після проникнення вірусних часток в клітину хазяїна таких, як розпізнавання клітинних білків, “покриття”, транспорт генетичного матеріалу. Дослідження флуорисцентно мічених вірусних часток ВІЛ виявили, що ВІЛ використовує динеїн-залежний трафік та мікротрубочки для переміщення до ядра під час зараження. В результаті взаємодії з клітинними білками успішно відбувається інтеграція вірусного генетичного матеріалу в геном господаря. Потенційна цінність розуміння процесу покриття та ролі р24 під час зараження полягає в можливості створення фармакологічних інгібіторів, які здатні стабілізувати вірусний капсид, що є критичним фактором під час зараження [42].

Розділ 3. Методи отримання промислових продуцентів

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Escherichia coli містить дволанцюгову ДНК ($3 \cdot 10^9$ Да), яка реплікується, залишаючись в кільцевій формі. Реплікація відбувається в двох напрямках: реплікаційні вилки виникають в одній точці і розходяться в різних напрямках від неї, поки знову не зустрінуться. В цій точці два повністю синтезованих дочірних ланцюги розділяються.

Гени в хромосомі розподіляються лінійно, і їх послідовність можна визначити. Хромосомну карту почали складати, вивчаючи час переносу генів при кон'югації, яку переривають через різні проміжки часу. Кон'югація — перенос генетичного матеріалу між клітинам через безпосередній контакт. Тому локалізацію генів визначають в хвилинах від 0 до 100. Початком переносу прийнято вважати початок гену *thr*. Послідовності розміщення нуклеотидів стало можливо визначати за допомогою рестрикційних ендонуклеаз і методу клонування генів. Хромосома *Escherichia coli* K-12 складається з 463900 п.н. (десь 4300 генів), із них 88,6 % — кодуєча частина геному. Гени бактерії, об'єднані в оперони, — певні функціональні комплекси. Оперон має наступний склад: ген регулятор кодує білок-репресор, який блокує ген оператор, промотор і структурні гени. Репресія знімається субстратом. Велика частка оперонів *E. coli* складається не більш ніж з трьох генів. В геномі містяться пари нуклеотидів, функції яких невідомі. Характерною ознакою для прокаріотів є відсутність типових інтронів, відповідно відсутній сплайсинг на рівні утворення мРНК. Крім хромосомних *E. coli* має позахромосомні фактори спадковості [5].

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розробив	Власенко Д.В.						
Консульт.							
Керівник	Литвина Г.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	35	110
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Багатокопійні плазміди невеликого розміру є зручним об'єктом для генної інженерії і часто використовуються як вектори для внесення необхідного матеріалу.

Даному організму властиві такі форми обміну генетичним матеріалом, як: трансформація, трансдукція, кон'югація і сексдукція, що робить його дуже привабливим для генних-інженерів як реципієнта для клонування ДНК.

Безперервна експресія чужорідного гену може виявитися смертельно-небезпечною для клітини-хазяїна, так як призводить до вичерпування енергетичних ресурсів і порушення метаболізму. Крім того плазміди, які несуть ген, що конститутивно експресується, часто втрачаються після декількох клітинних циклів через неконкурентність клітин, що є їх носіями перед клітинами, в яких дана плазміда відсутня. Для вирішення цієї проблеми необхідно навчитися контролювати експресію таким чином, щоб клонований ген зчитувався тільки в певній фазі клітинного циклу і тільки певний проміжок часу. Тож для ефективної експресії будь-якого гена необхідна наявність сильного промотора, який можна регулювати. Найбільш широко використовують такі промотори, як: промотори *lac*-, *trp*- оперонів, *p^L*- промотор бактеріофага λ , промотор гена 10 бактеріофага T7. Кожен з цих промоторів впізнається РНК-полімеразою *E.coli*, в який входить сігма-фактор, який міститься в великій кількості в клітині. Завдяки чому транскрипція не зупиняється по причині недостатчі сігма-факторів.

При відсутності лактози в середовищі, *lac*-промотор (частіше всього *lacUV5*) знаходиться в репресованому стані. Індукція проходить при додаванні лактози або ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиту (ІПТГ) в середовище. Ці речовини попереджають зв'язування репресора з *lac*-оператором, внаслідок чого починається транскрипція. Використання ІПТГ як індуктора є більш доцільним, так як він не метаболізується бактерією, відповідно відпадає необхідність постійно контролювати концентрацію. Транскрипцію, що контролюється *lac*-промотором можна також регулювати білком *CAP*.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Промотор *trp* вимикається під дією комплексу триптофан-*trp*-репресор. Індукція проходить або при видаленні триптофану з середовища, або при додаванні 3-індолілакрилової кислоти.

Робота промотора p^L регулюється термочутливим білком *cl₈₅₇*. Індукцію проводять так званим методом термо-шоку. Клітини, що синтезують цей репресор, вирощують при температурі 30°C (в цих умовах репресор блокує експресію). Коли культура перейде в необхідну фазу росту, температуру різко підвищують (за рахунок підвищення температури рубашки ферментера та внесення відносно гарячого поживного середовища) до 42°C, при якій *cl₈₅₇* інактивується, відповідно розблоковуючи транскрипцію.

Щоб мати можливість використовувати промотор бактеріофага *T7*, ген РНК-полімерази фага *T7* вбудовують в хромосому в складі профага λ , під контролем *lac*-промотора. Після чого клітини трансформують плазмідами, які містять ген-мішень під контролем *T7*-промотора. При додаванні ІПТГ в середовище індукується синтез РНК-полімерази фага *T7*, після чого відбувається транскрипція і трансляція клонованого гена. Часто між часом індукції гена РНК-полімерази фага *T7* і початком транскрипції клонованого гена проходить більше години. Для транскрипції сильного *T7*-промотора створена ціла серія *pET* векторів [5, 44, 45].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.

Першим етапом відбору продуценту при створенні будь-якого біотехнологічного виробництва є селекція штаму. Перед тим, як вдатися до різних генетичних модифікацій, необхідно вибрати компетентний до генетичних трансформацій штам *E.coli*.

Більшість штамів, що використовуються для синтезу рекомбінантних білків, походять від штаму лінії *K-12* або штаму лінії *B*. Штами лінії *K-12* використовувалися для генетичних і біохімічних досліджень. Вони мають мутації, які забезпечують високу якість і великий вихід плазмід. На даний час ці штами в основному використовуються для отримання великої кількості

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

плазмідної ДНК. Штами лінії *B* широко використовувалися в роботах по вивченню бактеріофагів *T5* і *T7*. Штами даної лінії широко використовуються для отримання рекомбінантних білків через ряд причин:

- відсутність джгутиків у даних штамів сприяє збереженню клітинних ресурсів, яке в свою чергу сприяє активнішому росту культури і збільшує вихід біомаси.
- Високий показник засвоєння глюкози. Навіть при високих концентраціях глюкози кількість утвореної оцтової кислоти залишається невисокою.
- Висока ефективність секретування білків в периплазму, в порівнянні з *K-12*.
- Біосинтез амінокислот проходить активніше ніж в *K-12*.
- Мають додаткову систему секреції II типу.
- Синтезують більше поринів *OmpF* з великим діаметром пор.
- Відносно мала кількість протеолітичних ферментів, відповідно збільшується вихід рекомбінантних білків через нижчий показник деградації білків.

До штамів лінії *B* відносять такі штами як: *REL606*, *BL21* і їх похідні *Rosetta*, *JM109*, *HMS174* і ін. [46].

Для конструювання плазмиди зразок вірусної РНК виділяють з сировотки крові ВІЛ-позитивних осіб. Використовуючи метод ПЛР зі зворотною транскрипцією на базі вірусної РНК синтезують кДНК. На першому етапі в буфер, в який було внесено зворотною транскриптазу, суміш праймерів, інгібітор РНКаз, вносять 5мкг виділеної вірусної РНК та суміш нуклеотидів. Зворотно транскрипційну полімеразну реакцію проводять в ампліфікаторі, який дозволяє швидко змінювати температуру. Температурний режим: 10хв при +25°C і 1год при +40°C. Зворотною транскриптазу дезактивують нагріванням суміші до +72°C і витримуванням при такій температурі 10хв. За допомогою рестриктаз отримують фрагменти

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДНК. Ці фрагменти розганяють на поліакриламідному гелі електрофорезом. Необхідну ділянку вирізають, розплавляють при $+68^{\circ}\text{C}$, екстрагують фенолом, концентрують ізобутанолом і осаджують етанолом. На другому етапі, використовуючи ДНК-полімеразу, отриманий генетичний матеріал клонують. Продукт ПЛР очищають і клонують в Т-вектор з використанням ТА-клонуючого набору.

Отриманою плазмідною трансформують клітини продуцента. Ефективність трансформації визначається за кількістю трансформованих клітин при додаванні 1мкг ДНК і залежить від компетентності клітин. В більшості випадків компетентність клітин необхідно індукувати. Для цього необхідно обрати один з існуючих методів або комбінацію.

Хімічна індукція. Маніпуляції проводять в ламінарному боксі. Клітини охолоджують до $+4^{\circ}\text{C}$. За такої температури в осад відцентрифугованої культуральної рідини вносять охолоджений 50мМ розчином CaCl_2 . Витримують 20 хвилин при цій же температурі. Отримані компетентні клітини проводять їх трансформацію плазмідною ДНК методом “теплого шоку”, витримуючи суміш 1,5 хв при $+42,0^{\circ}\text{C}$. Після чого епендорфи з сумішшю переміщують на 5хв на лід.

Електропорація. Через суспензію об’ємом 50мкл пропускають одиничний імпульс струму (25мкФ; 2,5кВт; 200Ом) протягом 4,5мс. Під дією струму в мембрані утворюються тимчасові пори. Через ці пори плазмідна ДНК потрапляє в клітину [47, 48]

Кон’югація. Плазмідна ДНК потрапляє в низько компетентну клітину за природнім механізмом передачі плазмід. Є можливість перенести ДНК у складі вектора з мобілізаційними властивостями в присутності іншої плазміди, що має кон’югативні властивості.

Для підвищення рівня експресії рекомбінантних білків необхідно стабілізувати рекомбінантну плазмиду, забезпечити стабільність, ефективність і контрольованість транскрипції і трансляції мРНК цільового-

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

гена, забезпечити стійкість трансльованого поліпептида, подбати про коректний фолдинг цільового білка.

Є і інші методи трансформації. Але в даному випадку буде достатньо провести основні: хімічну індукцію і електропорацію.

Отриманий штам-продуцент необхідно випробувати штучним добором. Прикладом такого добору є вирощування бактерій на середовищі з антибіотиком. На такому середовищі можуть вижити лише бактерії, що мають фактори резистентності, які заковані в плазміді. Клітини дикого типу не проростають.

Підвищення стабільності рекомбінантної плазміді досягається інактивацією системи метилювання / рестрикції чужерідної ДНК, внутрішньоклітинних нуклеаз, системи рекомбінації і інших.

Для забезпечення стабільності мРНК після транскрипції необхідно попередити дію екзонуклеази II, ендонуклеази і полінуклеотид-фосфорилаз. Можливим шляхом вирішення цієї проблеми є інактивація гену *rne131*.

Експресійною системою для ВІЛ є організм людини (еукаріотичний). При трансляції еукаріотичних білків прокаріотами постає проблема доступності тРНК, які впізнають кодони, що рідко зустрічаються. Прикладом вирішення цієї проблеми є використання штаму *E. coli BL21-Rosetta*, що містить додаткові кодони з додатковими тРНК для лейцинового кодону CUA, гліцинового кодону GGA, пролінового кодону CCC і аргінінових кодонів AGG, AGA, CGG.

Для коректної укладки білка при сильній експресії практикують культивування при понижений температурі. Для зменшення впливу протеолітичних ферментів на поліпептид вводять мутації в генах *lon*, *clp* і *groH* (*htpR*), які кодують протеази і сігма-фактор РНК-полімерази.

Контроль експресії в векторах серії *pET* здійснюється з використанням промотора бактеріофага T7, який не розпізнається бактеріальною РНК-полімеразою. Ген, що кодує T7 РНК-полімеразу, вбудовують в геном клітини в вигляді профага $\lambda DE3$ під контролем промотора *lacUV5*. Така система може

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

похизуватися значною швидкістю транскрипції — 230 нуклеотидів за секунду, що в 5 разів швидше ніж РНК клітини-господаря. Система *pET* характеризується високою продуктивністю і тому широко застосовується для отримання рекомбінантних білків. Одним з недоліків даної системи є можливість спонтанної індукції внаслідок базальної експресії *T7* РНК-полімерази. Є декілька причин спонтанної активації промотора:

- в середовищі можуть бути присутні слідові концентрації лактози/ІПТГ;
- нестача білка-репресора через високе число копій плазмід;
- білок-репресор не здатний зі 100% ефективністю блокувати транскрипцію;
- транскрипція може запускатися іншим промотором.

Цю проблему можна вирішити введенням плазмиди *pLysS*, в складі якої міститься ген, що кодує *T7* лізоцим — природний інгібітор *T7* РНК-полімерази. *T7* лізоцим інактивує *T7* РНК-полімеразу, що синтезується на базальному рівні. При внесенні ІПТГ індукується ген, що кодує *T7* РНК-полімеразу і її рівень стає набагато вищий, ніж *T7* лізоциму внаслідок чого відбувається ефективна транскрипція цільового гену. Також для зменшення рівня базальної експресії в системах з використанням *lac*-промотора, можна додати в середовище 1% глюкози.

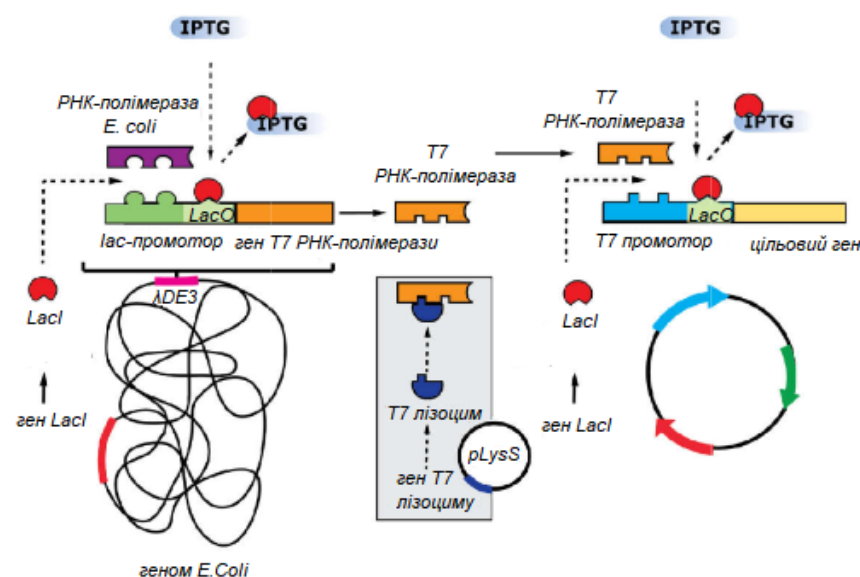


Рис. 3.2.1 Регуляція експресії генів в *pET*-системі [46]

Промотор *lacUV5* репресується білком *LacI*, який зв'язується після нього в положенні від +1 до +21 і інгібує транскрипцію генів. При внесенні лактози, яка під дією бета-галактозидази перетворюється на аллолактозу або при внесенні аналога ІПТГ, які в свою чергу взаємодіють з білком репресором. Дана взаємодія спричиняє конформаційні зміни білка-репресора внаслідок чого він втрачає афінність до оператора ДНК.

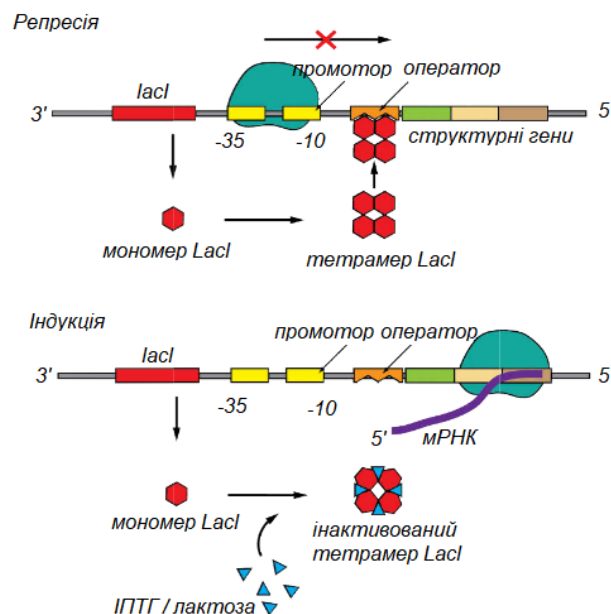


Рис. 3.2.2 Регуляція лактозного оперона *E. coli* [46]

Також транскрипція регулюється білком-активатором катаболізму CAP, який сприяє зв'язуванню РНК-полімерази з промотором в комплексі з циклічним АМФ. Достатня кількість циклічного АМФ знаходиться в клітині за умови відсутності глюкози в середовищі. Активуючий комплекс CAP-цАМФ зв'язується з ДНК в положенні -65. Використання нового промотора *lacUV5* зменшує залежність ініціації транскрипції від утилізації глюкози [47, 49].

Сучасний ринок послуг в сфері генної інженерії дає можливість не витратити час на дуже трудомісткий процес відбору і селекції. В даний час є можливість придбати штаб, який якнайкраще підходить для поставлених задач.

З огляду на описані вище проблеми і методи їх рішень необхідно вибрати компетентні клітини, які можуть дати високий рівень експресії гетерологічних білків. Одним з таких рішень є штам *Rosetta(DE3)pLysS*. Даний штам адаптований для продукування білків, кодованих в векторах *pET*.

Генотип *E. coli Rosetta(DE3)pLysS: F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE6 (CmR)* [49]

В літературних джерелах описується використання багатьох плазмід для отримання рекомбінантного аналогу білка p24, зокрема: *pQE30-p24*, *pYCM-p24*, *pET51b (+) _ SNAP-p24*, *pRIT2T/p24*, *pCMVΔ8.91 та pET-15b-p24*.

Серед векторів, які можна обрати, на думку автора, слід звернути увагу на *pET-39b(+)*, яка забезпечує підвищений вихід цільового білку в периплазму, що є більш сприятливим середовищем для фолдингу [49, 50, 51, 52, 53].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Процес конструювання плазмід можна умовно розділити на 3 стадії:

1. Синтез кДНК або ж отримання ДНК з геному.
2. Синтез рекомбінантної ДНК — з'єднання необхідного фрагменту з вектором.
3. Трансформація клітини-реципієнта. Селективний добір клонів.



Рис. 3.3.1 Схема одержання штаму-продуцента

Для створення компетентного штаму використовують плазмиду *pET-15b-p24*, яку можна комерційно придбати. Дана плазміда містить генетичну послідовність, яка кодує синтез капсидного білка *p24*. Трансформація проведена комбінацією методів хімічної індукції трансформації та електропорації.

Трансформовані штами висівають на елективне середовище (М9 з ампіциліном). Відбирають колонії що змогли вирости.

Перевіряють на здатність до синтезу цільового білка, додаючи індуктор експресії цільового білка *p24* — ІПТГ. Здатність до синтезу перевіряють за допомогою електрофорезу осаду клітин. Одержані штами відправляють на збереження в спеціальну морозильну камеру, з температурою -70°C .

3.4. Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

Обраний продукт кодується плазмідною і не синтезується клітиною в нативному вигляді. Цей білок накопичується в клітині у вигляді тілець-включень. Тож підлягає відмиванню та очистці. Фінальна очистка здійснюється до ступеня чистоти $>90\%$ методом хроматографічної очистки.

Так як клітина *E. coli* не може синтезувати білок *p24* в нативному вигляді, то отриманий білок обов'язково піддається рефолдингу.

Для зменшення рівня базальної експресії та стимуляції росту біомаси на початкових фазах росту в середовище додають 1% глюкози. Однак глюкоза інгібує експресію цільового гена, тому для підвищення її засвоєння, в середовищі необхідно підняти рівень кисню. Це можна здійснити за допомогою барботування киснем, повітрям, ін. сумішшю газів. Найбільш ефективним є барботування киснем при активному перемішуванні середовища.

Для правильної укладки білка під час синтезу необхідно дотримуватись оптимального рівня рН, що в більшості випадків лежить в межах 7,0~8,0. Для *E.coli* значення оптимуму лежить в межах $\text{pH}=6,7\sim 7,5$. Протягом усього

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

процесу необхідно регулювати показник, для дотримання оптимуму, так як він постійно змінюється через накопичення метаболітів.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розділ 4. Технологічна частина

4.1. Характеристика кінцевої продукції

Назва: рекомбінантний білок *p24* вірусу імунодефіциту людини.

Діючі нормативно-технічні документи: ТУ У 24.4-24265186-014:2012

«Білки-антигени рекомбінантні очищені».

Галузі використання: для виробництва антитіл анти-*p24* на стадії очистки, для перевірки тест систем, що містять антит-*p24*, для виробництва тест систем, що дозволяють детектувати антитіла до ВІЛ-1 в крові людини.

Зовнішній вигляд і фізико-хімічні характеристики: прозорий буферний розчин (рН 7,4) з розчиненим в ньому, хроматографічно очищеним, рекомбінантним білком *p24*. Чистота препарату > 95%. Концентрація білку 2мг/мл. Чутливий до зміни рН, до дії окисників та відновників. При нагріванні до +45°C денатурує. Чутливий до повторення циклів розморожки-заморожки.

Вимоги до фасування, пакування, маркування, зберігання і транспортування продукту, до терміну придатності продукту.

Форма випуску: розчин у пластикових флаконах. Не більше 1000 μ г в флаконі.

Фасування: флакони заповнюють розчином, закривають пластиковими кришками, додатково герметизують парафілом. На флакон наклеюють етикетки-самоклейки за ТУ У 21521832.001-98

Пакування: Флакони разом з листками-вкладками поміщають в картонні коробки з ущільнювачем, що має захищати флакони від механічних пошкоджень.

Маркування: на етикетці повинно бути вказано державною та англійською мовами:

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив	Власенко Д.В.						
Консульт.							
Керівник	Литвина Г.С.						
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	48	110
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

- країна-виробник;
- підприємство-виробник;
- товарний знак виробника;
- адреса виробника;
- назва компоненту з позначкою "in vitro";
- концентрація;
- об'єм;
- термін придатності;
- номер серії;
- умови зберігання.

Зберігання та термін придатності: зберігати за температури +2 - +8°C протягом місяця.

Транспортування: не є небезпечним продуктом. Обмеження на перевезення відсутні. Не порушувати правил зберігання.

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.

	Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
	I	II	III	IV
1	Основна сировина:			
1.1.	Агар-агар	Merck № 101614	-	For microbiology
1.2.	Амоній сульфат	ГОСТ 3769-78	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ХЧ
1.3.	Амоній хлорид	ГОСТ 3773-72	вологість, вміст азоту,	ХЧ

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

			хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	
1.4.	Ампіциліну натрієва сіль	ФС-42У-3-200-97	Зовнішній вигляд, масова частка вологи, розчинність, активність по відношенню до тест- культури	For microbiolo gy
1.5.	Вода деіонізована	ДСТУ 7525:2014	Кольоровість, каламутність, запах, рН, жорсткість	ХЧ
1.6.	Гідролізат казеїну	Merck № 102245	Зовнішній вигляд, масова частка вологи, сухих речовин, азоту, амінокислот, мікроелементів	For microbiolo gy
1.7.	Гідроперекис сечовини	Merck № 818356	придатність в ІФА	GR for analysis
1.8.	Глюкоза	ГОСТ 6038-79	вологість, вміст кислот, хлоридів, сульфатів, заліза, свинцю, миш'яку	ХЧ
1.9.	Дріжджовий екстракт для мікробіології	Merck № 103753	Зовнішній вигляд, масова частка вологи, сухих речовин, азоту, амінокислот, мікроелементів	For microbiolo gy

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

1.10.	Калій фосфорнокислий однозаміщений	ГОСТ 4198-75	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ЧДА
1.11.	Калій хлористий	ГОСТ 4234-77	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ХЧ
1.12.	Кислота бензойна	ГОСТ 10521-78	придатність в ІФА	ЧДА
1.13.	Кислота сірчана	ГОСТ 4204-77, зм. 1,2	придатність в ІФА	ХЧ
1.14.	Кислота соляна	ГОСТ 3118-77	придатність в ІФА	ХЧ
1.15.	Кислота орфосфорна	ТУ 6-09-5480-90	придатність в ІФА	ОСЧ
1.16.	Магній сірчаноокислий	ГОСТ 4523-77	придатність в ІФА	ХЧ
1.17.	Магній сульфат 7-водний	ГОСТ 4523-77	придатність в ІФА	ХЧ
1.18.	Натрію азид	Merck № 822335	придатність в ІФА	For synthesis
1.19.	Натрій вуглекислий	ГОСТ 83-79	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ХЧ
1.20.	Натрій фосфорнокислий 2- зам. 12-водний	ГОСТ 4172-76	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію,	ХЧ

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

			кальцію, заліза, свинцю	
1.21.	Натрій хлористий	ГОСТ 4233-77	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ХЧ
1.22.	Натрій боргідрат	Merck № 806372	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	Fine granular for syntesis
1.23.	Натрію гідроокис	ГОСТ 4328-77	вологість, вміст азоту, хлоридів, сульфатів, натрію, кальцію, заліза, свинцю	ХЧ
1.24.	Натрію цитрат	Merck № 106448	-	GR for analysis
1.25.	Пептон з казеїна	Merck № 107213	Ростовий показник	For microbiolo gy
1.26.	Пероксидаза хрону	Sigma № P 6782	активність	For biochemist ry
1.27.	Сечовина	Merck № 108488	придатність в ІФА	For biochemist ry
1.28.	Твін-20	Merck № 822184	-	For syntesis
1.29.	Трегалоза	Merck № 108216	придатність в ІФА	For biochemist ry
1.30.	Триптонова вода	Merck № 110859	Ростовий	For

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

			показник	microbiology
1.31.	Тритон X-100	Merck № 108603	придатність в ІФА	GR
1.32.	Феноловий червоний	ТУ 6-09-5170-84	придатність в ІФА	ЧДА
1.33.	Хлороформ	ТУ 6-09-4263-76	придатність в ІФА	ХЧ
1.34.	ЕДТА	ТУ 6-09-11-1721-83	придатність в ІФА	ЧДА
1.35.	Гуанідін хлорид	Merck № 104220	99,0 %	Lab
1.36.	Гуанідін гідрохлорид	ICN № 194826	99,0 %	Lab
1.37.	б-галактозидаза	Sigma № G5635	придатність в ІФА	GR for analysis
1.38.	Леупептин	Sigma № L2023	придатність в ІФА	GR for analysis
1.39.	Статин	Sigma № N7390	придатність в ІФА	GR for analysis
1.40.	Диметілформамід (ДМФА)	ГОСТ 20289-74	-	For biochemistry

2. Допоміжна сировина

2.1.	Акриламід	Merck № 110784	-	For electrophoresis
2.2.	Амонію персульфат	Merck № 101200	-	Extra pure
2.3.	Ацетон	ГОСТ 2603-79	-	ХЧ
2.4.	Бромфеноловий синій водорозчинний	ТУ 6-09-4530-77	-	ЧДА
2.5.	Гліцин	Merck № 104169	-	For electrophoresis
2.6.	Гліцерин	ГОСТ 6259-75	-	ХЧ або ЧДА
2.7.	ДНК-аза	Merck № 116326	Втрата в'язкості лізованої біомаси	For biochemistry

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

2.8.	Імідазол	Merck № 104716	pH	Buffer substans
2.9.	Кислота оцтова	ГОСТ 61-75	-	ХЧ
2.10.	Кислота трихлороцтова	ТУ 6-09-1926-77	-	Ч
2.11.	Кумасі R-250	Merck № 102085	-	For electrophoresis
2.12.	Лізоцим	Merck № 105281	-	For biochemistry
2.13.	2-меркаптоетанол	Merck № 805740	-	For synthesis
2.14.	Мідь сірчаноокисла	ГОСТ 4165-78	-	ХЧ або ЧДА
2.15.	Натрій оцтовокислий 3-водний	ГОСТ 199-78	-	ХЧ
2.16.	Натрію додецилсульфат	Merck № 113760	-	LAB
2.17.	Нікель сірчаноокислий	ГОСТ 4523-77, ГОСТ 4465-74	-	ЧДА
2.18.	Олія вазелінова медична	ГОСТ 3164-78	-	-
2.19.	Перекис водню	ТУ 6-224.00556-052-98	-	ЧДА
2.20.	Поліетиленгліколь	Sigma № P4463	молек. маса	-
2.21.	Поліетиленгліколь 35000	Fluka № 03557	-	PhEur
2.22.	Спирт етиловий	ТУ 6-09-1710-77	-	для ветеринарної медицини
2.23.	ТЕМЕД	Merck № 110732	-	GR for analysis
2.24.	Трис (гідроксиметил)аміноетан	Merck № 108387	придатність в ІФА	LAB
2.25.	Фенілметилсульфонілфторид	Merck № 107349	-	For biochemistry
2.26.	Фосфора п'ятиокис	ТУ 6-09-4173-85	взаємодія з водою	Ч

2.27.	Натрію піросульфат	ТУ 6-09-5404	-	Ч
2.28.	Рибонуклеаза А	ICN № 101076	-	Bovine pancrease
2.29.	РНК	ICN № 102821	-	Субстанція для РНКаз
2.30.	Натрій хлористий	ГОСТ 1383-97 ДСТУ 3583-97	-	Кухона поварена «Екстра»
2.31.	М'ясо-пептонний агар	ДП «Біофарма»	-	For microbiology
2.32.	М'ясо-пептонний бульон	ДП «Біофарма»	-	For microbiology
2.33.	Середовище Сабуро	ДП «Біофарма»	-	For microbiology
2.34.	Тетрацикліну гідрохлорид	Merck № 108189	-	Фармакопейний
3.	Матеріали			
3.1.	Ампули пластикові	Sarstedt № 72730003	-	-
3.2.	Ампули пластикові	Nalgene Brand Products № 362800-0005,	-	-
3.3.	Бинт	ГОСТ 1172-93	-	-
3.4.	Біхромат калію	ГОСТ 4220-75, ГОСТ 4459-75	-	ХЧ або ЧДА
3.5.	Біхромат натрію	ГОСТ 4237-76	-	ХЧ або ЧДА
3.6.	Вата медична	ГОСТ 5556-81	-	-
3.7.	Вапно хлорне	ГОСТ 1692-85	-	Марка Б
3.8.	Вугілля активоване	ТУ 6-09-40-511-84	-	Ч
3.9.	Господарські засоби:		-	-
3.10.	Брілло	ТУУ00146137.024-99	-	-

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

3.11.	Порошок пральний	-	-	-
3.12.	Рукавички господарські гумові	-	-	-
3.13.	Пакети для сміття	-	-	-
3.14.	Мило рідке туалетне	ОСТ 18-336-78	-	-
3.15.	АХД 2000	Лізоформ	-	Для дезинфекції
3.16.	Лізоформін	Лізоформ	-	Для дезинфекції
3.17.	Крем для рук	Majola®-H5-Creme	-	Захист рук
3.18.	Кришки до ампул пластикових	Sarstedt № 65716003 (чер.); 65716005 (зел.); 65716001 (син.)	-	-
3.19.	Кришка до флакона пластикового	ТУ 21643937-001-2000	-	-
3.20.	Лейкопластир	ФС 42-2241-95	-	-
3.21.	Марля медична	ГОСТ 16427-93	-	-
3.22.	Мембрана нітроцелюлозна Дп=0,22 мкм	Millipore № GVWP 02500	Цілістність	-
3.23.	Мембрана нітроцелюлозна Дп=0,45 мкм	Millipore № A045 A047 A	Цілістність	-
3.24.	Наконечники, 20-200 мкл	Sarstedt № 70760 001	-	-
3.25.	0-300 мкл	Finntip 401250	-	-
3.26.	20-1000 мкл	Sarstedt № 70762	-	-
3.27.	Набір маркерних білків № VIII	Merck № 111536	-	-
3.28.	Набір маркерних білків № IV	Merck № 115791	-	-
3.29.	Пакет з поліетиленової плівки	ТУ У 20067704002-99	-	-
3.30.	Парафілм М. 4 □ 125, 2 □ 250	Sigma № p-7793, p-7543	-	-
3.31.	Папір індикаторний	Schleicher&Schull	-	-

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

		№ 37040 ТУ 6-09-1181-76		
3.32.	Папір канцелярський А-4	Xerox	-	-
3.33.	Папір лабораторний фільтровальний	ТУ 2642-001- 426224157-98 Filtrak (зелений)	-	-
3.34.	Папір клейкий ярликовий	Xerox, Apli, Raflatas	-	-
3.35.	Папір обгортковий	ГОСТ 8273-75	-	-
3.36.	Папір технічний	ГОСТ 1760-86	-	-
3.37.	Рукавички хірургічні гумові	ГОСТ 3-88	-	-
3.38.	Серветка з безворсової тканини	ГОСТ 16428-89	-	-
3.39.	Скотч		-	-
3.40.	Смола іонообмінна для установки очистки води	Lewatit № SM94	-	-
3.41.	Стандарт титр сироваток для рН-метрії	ТУ 6-09-2540-87	-	-
3.42.	Сорбент Q-Sepharose Fast Flow	Sigma GE17-0510- 01	сорбц. ємкість	-
3.43.	Колонка Mono Q HR 16/10	Sigma GE17-0506- 01	сорбц. ємкість	-
3.44.	Sephadex G50	Sigma G50150	сорбц. ємкість	-
3.45.	Таблетка для санітаризації RO мембран	Millipore № ZWCL01F50	-	-
3.46.	Таблетка для очистки RO мембрани	Millipore № ZWBASE012	-	лужна
3.47.	Таблетка для очистки RO мембрани	Millipore № ZWASID012	-	кислотна
3.48.	Тальк	ГОСТ 12087-77	-	-
3.49.	Транспортна тара	ДСТУ 2044-92	-	-
3.50.	Трубка діалізна	Serva № A44145	-	43 мм
3.51.	Фільтр з активованим вугіллям, EP-5 (EP-10)	USFilter	-	-
3.52.	Фільтр з активованим	USFilter	-	-

	вугіллям, СС-10			
3.53.	Фільтр нітроцелюлозний для предфільтрації, AP 15	Millipore № AP1504700	-	-
3.54.	Фільтр нітроцелюлозний та ацетатцелюлозний Ø 0,45 мкм	Millipore № HAWP04700	-	-
3.55.	Фільтр нітроцелюлозний та ацетатцелюлозний Ø 5 мкм	Millipore № SMWP04700	-	-
3.56.	Фільтр поліестерний, R30 (R20)	USFilter	-	-
3.57.	Флакони пластикові	ТУ У 23455985-001-97	-	-
3.58.	Фольга пакувальна	12ПЕТ/9АЛ/45ПЕ, ELIF Plastik, Туреччина, PET/AL/PE	-	-
3.59.	Етикетка внутрішня, (30×20) мм	-	-	-
3.60.	Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147-80	-	-
3.61.	Колба Бунзена	ТУ 92-891.024-91	-	-
3.62.	Колба термостійка	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.63.	Колба мірна	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.64.	Колба Ерленмейера	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.65.	Комплекти одягу чоловічі та жіночі для чистих приміщень	ТУ У 16293843.007-2000	-	-
3.66.	Кювета для спектрофотометрії, 3 мл	Sigma № S-10C	-	Кварцова
3.67.	Кювета для спектрофотометрії, 0,5 мл	Sigma № S 5178	-	Кварцова
3.68.	Лійка скляна	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.69.	Ножиці прямі	ГОСТ 21239-77	-	-
3.70.	Окуляри захисні	ГОСТ 12.4.013-97	-	-
3.71.	Паки (холодоагент)	-	-	-
3.72.	Паличка скляна	ТУ 64.2.235-78	-	-
3.73.	Пінцет	ГОСТ 21241-89Е	-	-

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

3.74.	Піпетка автоматична на 2-20 мкл	Ленпіпет	-	-
3.75.	Піпетка автоматична на 20-200 мкл	Ленпіпет	-	-
3.76.	Піпетка автоматична на 50-200 мкл	Ленпіпет	-	-
3.77.	Піпетка автоматична на 200-1000 мкл	Ленпіпет	-	-
3.78.	Піпетка автоматична 8-канальна на 0-200 мкл	Ленпіпет	-	-
3.79.	Піпетка скляна на 1, 2, 5, 10 (мл)	ГОСТ 20292-74Е	-	-
3.80.	Пробірка скляна центрифужна	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.81.	Пробка гумова	ТУ 38.006108-90	-	-
3.82.	Респіратор	ГОСТ 12.4.041-89	-	-
3.83.	Скальпель	ГОСТ 21240-77	-	-
3.84.	Спиртівка СЛ-1 (СЛ-2)	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.85.	Стакан мірний на 0.7, 1, 2 (л)	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.86.	Стакан центрифужний на 0.25, 0.5, 1 (л)	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.87.	Ступка порцелянова	ГОСТ 9147-80Е	-	-
3.88.	Трубка силіконова	ТУ 38.106-152-77	-	-
3.89.	Трубка гумова вакуумна	ГОСТ 3399-76	-	-
3.90.	Фартух прогумлений	ГОСТ 12.4.029-76	-	-
3.91.	Флакони для реактивів на 500, 1000 мл	ГОСТ 23932-79Е	-	-
3.92.	Халат медичний жіночий	ГОСТ 24760-81	-	-
3.93.	Халат медичний чоловічий	ГОСТ 25194-62	-	-
3.94.	Шапочка бавовняна	ГОСТ 23134-78	-	-
3.95.	Щиток НБТ-1	ГОСТ 12.4.023-84	-	-
3.96.	Шпагат технічний	ГОСТ 15266-70	-	-
3.97.	Шприц медичний одноразовий: 1 2, 5, 10, 20,50 (мл)	Becton Dickinson	-	-
3.98.	Штатив універсальний	Salex № А 4030/1	-	-

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

	Бунзена малий			
3.99.	Чашка Петрі	ГОСТ 25336-82Е	-	-
3.100	Циліндр мірний на: 0.01, 0.25, 0.5, 1, 2 (л)	ГОСТ 25336-82Е	-	-
4.	Напівпродукти			
4.1	Біомаса штама продуцента р- 24	-	-	Замороже на при - 70°C

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Здійснюється з метою створення безпечних умов праці та охорони здоров'я персоналу, забезпечення якості продукції та запобігання потрапляння забруднень в продукцію.

ДР 1.1 Підготовка вентиляційного повітря

Здійснюється з метою забезпечення виробничих приміщень чистим повітрям та створенням в них сприятливих для праці мікрокліматичних умов.

Для досягнення цієї мети використовується трьохступенева очистка повітря. Використовуються фільтри грубої та тонкої очистки. Повітря нагрівають або кондиціонують в залежності від погодних умов.

Раз на місяць фільтри стерилізують гострою парою при 125-135°C один раз на місяць. Відпрацьовані фільтри замінюють на нові.

ДР 1.1.1 Забір повітря

Повітря забирають з атмосфери через забірну шахту висотою 20-30м. Висота залежить від забрудненості повітря на даній території.

ДР 1.1.2 Попередня очистка повітря

Здійснюється за допомогою фільтра типу G-3. Розмір часток що затримується >10 мкм. Відносність очистки 80-90%.

ДР 1.1.3 Стабілізація повітря

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

Повітря стабілізують охолоджуючи / нагріваючи до +20°C. Межі вологості повітря що надходить до приміщень 40-60%. Контролюється за допомогою вологоміра, регулюється зволожувачами.

ДР 1.1.4 Фільтрування через фільтри І ступеня

Здійснюється за допомогою головного фільтра типу F-6. Розмір часток що затримується >1,5мкм. Відносність очистки 60-80%.

ДР 1.1.5 Фільтрування через фільтри ІІ ступеня

Здійснюється за допомогою фільтра типу Н-11. Розмір часток, що затримується >0,3 мкм. Відносність очистки 95%.

ДР 1.2 Приготування миючих та дезинфікуючих розчинів

При приготуванні миючих а дезинфікуючих розчинів особлива увага звертається на захист працівника від дії агресивних концентратів миючих засобів.

Для приготування необхідну кількість концентрату відміряють мірним стаканом або зважують на терезах. Розчиняють або / і доводять до необхідної концентрації деіонізованою / питною (в залежності від об'єкту призначення) водою.

Для мийки використовують миючий засіб "Brillo". Для дезинфекції робочих поверхонь використовується розчин 70% етилового спирту. Термін зберігання приготованих розчинів 5-6 днів. Спороцидна і бактерицидна активність даних розчинів підвищується з підвищенням температури. Використовується для обробки виробничих приміщень та обладнання.

Для обробки рук персоналом використовуються комерційні засоби «Стериліум» і «АХД».

ДР 1.2.1 Підготовка розчину миючого засобу

Розчин готують для разового використання. Розраховану кількість порошкоподібного синтетичного миючого засобу розчиняють водопровідною водою при температурі 40-50 °C та перемішуванні при 40 об/хв. Після приготування 5% миючого розчину його переміщують у збірник і

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

використовують для обробки виробничих приміщень та для мийки вузлів обладнання.

ДР 1.2.2 Приготування розчину перекису водню 3%

3% розчин перекису водню готують шляхом додавання концентрованого перекису до води, а потім додавання до розведеного розчину перекису водню миючого засобу МЗ при температурі 40-50 °С та перемішуванні при 40 об/хв.

ДР 1.2.3 Приготування розчину етилового спирту 70%

Приготування даного розчину регламентоване наказом МОЗ України №197 від 07.09.93. Змішують 675,0 мл етилового спирту 96% і 325,0 мл води питної. Густина 0,886-0,883кг/л, що відповідає вмісту C_2H_5OH 70-71% (об.).

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень

Для підготовки приміщень до роботи проводять щоденні та генеральні прибирання.

Щоденне прибирання проводиться перед початком роботи. Включає в себе: протирання робочих поверхонь та обладнання 70% розчином етилового спирту. В кінці робочого тижня всі поверхні протирають 3% розчином перекису водню з 0,5% МЗ.

Генеральне прибирання проводиться один раз на місяць. Включає в себе: протирання всіх робочих поверхонь і обладнання, включаючи поверхні холодильників, термошаф і т.п. 70% розчином етилового спирту, протирання дверей, ручок, підлоги 3% розчином перекису водню з 0,5 МЗ, з розрахунку 100мл/м³.

Інвентар після проведення робіт знезаражують витримуванням в миючому розчині протягом 3 годин.

Регулярно здійснюють мікробіологічний контроль поверхонь і повітря в виробничому приміщенні.

Допускається не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х чашках Петрі, при засіві змивів зі 100 см² поверхні. При виявленні спороутворюючих мікроорганізмів концентрацію перекису водню збільшують до 6%, концентрацію спирту збільшують до 76%.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 1.4 Підготовка комунікацій, обладнання та посуду

ДР 1.4.1 Мийка та дезинфекція

Для підготовки обладнання його миють, оброблюють дезинфікуючими розчинами, зйомні частини і ємності стерилізують. Для мийки використовують миючий розчин “Brillo”, для дезинфекції — перекис водню та етиловий спирт.

Частини, які безпосередньо контактують з сировиною, старанно миють деіонізованою водою. Частини, які контактують з потенційно біологічно-небезпечними речовинами, обробляють дезинфікуючим розчином.

Зовні металічні поверхні обробляють етиловим спиртом, не металічні — розчином перекису водню.

Лабораторний посуд миють на спеціально облаштованій мийці. Для досягнення необхідного рівня чистоти використовують механічні та хімічні методи. Механічні: обробка за допомогою спеціальних щіток і йоржиків різних розмірів та форм. Хімічні: застосування різних хімічних сполук і миючих засобів.

ДР 1.4.2 Ополіскування посуду і обладнання

Ополіскування проводиться з використанням деіонізованої води. Зйомні частини обладнання, що безпосередньо взаємодіють з виробничою сировиною, демонтують, розбирають і ретельно вимивають при температурі води +36 °C упродовж 30 хв.

Посуд ретельно промивають гарячою водою, а потім 2-3 рази обполіскують деіонізованою водою.

ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання та посуду

Обладнання, комунікація і посуд стерилізують гострою парою при тиску 0,2 МПа, температурі +140°C протягом 1 години (якщо не має інших заданих умов для апарату). Апарат перевіряють на герметичність, подаючи надлишковий тиск в систему 0,25 МПа і протягом 30 хв спостерігають за змінами показів манометра. Вони мають бути незмінними.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

Посуд стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 1 години. Для контролю автоклавування використовують хімічні і біологічні термоіндикатори.

ДР 1.5 Підготовка одягу

Технологічний одяг персоналу, що має контакт з потенційно інфекційними матеріалами, двічі на місяць стерилізують автоклавуванням (2атм 30хв) і передають на прання окремо від іншого одягу, ці комплекти одягу використовують тільки в приміщеннях з відповідним статусом. Технологічний одяг персоналу, що не має контакту з потенційно-інфекційними матеріалами, двічі на місяць передають на прання без попередньої стерилізації.

Прання одягу триває 45 хвилин в пральній машині типу автомат при 40 °С. В ній же здійснюється полоскання і віджим. Випраний одяг сушать у сушильній шафі при 80 – 90 °С протягом години. Одяг, що підлягає стерилізації, пакують в чохли для стерилізації. Стерилізують при тиску 0,9МПА протягом 45 хвилин.

Після вищевказаних операцій одяг пакують в пакети, на які наклеюють етикетки з позначенням статусу, і передають відповідним робітникам.

Огляд технологічного одягу і оцінку ступеня зношення проводять перед пранням. За необхідності одяг ремонтують або замінюють на новий.

ДР 1.6 Підготовка персоналу

ДР 1.6.1 Медичний огляд

Стаття 169 Кодексу законів про працю України та стаття 17 Закону України “Про охорону праці” від 14.10.1992 р — роботодавець зобов’язаний за власний кошт організувати медичний огляд при прийомі на роботу і періодично організовувати медичний огляд працівників, що працюють за шкідливих або ж небезпечних умов праці.

ДР 1.6.2 Навчання, перевірка рівня компетенції працівників

Організацією навчання займається відділ кадрів. Навчання проводять працівники відділу кадрів, працівники інших відділів, що отримали доручення від керівництва підприємства, зовнішні спеціалісти.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для допуску працівників до робіт з підвищеним рівнем небезпеки, працівникам необхідно пройти сертифікацію в спеціалізованих освітніх центрах, які ліцензовані міністерством освіти і мають дозвіл від Держнаглядохоронпраці на проведення такого навчання.

Навчальні плани узгоджуються з керівництвом підприємства і мають включати як теоретичну частину, так і виробничу.

ДР 1.6.3 Підготовка персоналу до роботи

Вхід працівників у виробничу зону відбувається наступним чином. Працівники знімають верхній одяг та перевзуються в перехідне взуття в гардеробній зоні. Персонал знімає одяг і перехідне взуття, залишаючи лише білизну, залишає одяг в індивідуальних шафах в першому приміщенні санпропускника. Працівники взувають індивідуальні капці, після чого йдуть в душову кімнату, де за необхідності приймають душ, обробляють руки дезінфікуючим розчином, прямують в друге приміщення санпропускника, в якому одягають робочий одяг, технологічний одяг.

Персонал, що працює з потенційно інфекційними матеріалами перед входом в бокс переодягається в комплект одягу для боксу.

ДР 2. Підготовка води очищеної і деіонізованої

Воду водопровідну пропускають через фільтри з діаметром пор до 0,2мкм під тиском 0,1 атм для попередньої очистки.

Деіонізовану воду для виробничих потреб отримують за допомогою приладу «Milli RX-20» (Ф1) або «EPRO-450» (Ф2). Працівник дільниці здійснює контроль ступеня деіонізації за допомогою автоматичного датчика питомого опору. Питомий опір лежить в межах 10-15МОм. Деіонізовану воду збирають в спеціальний збірник.

Деіонізована вода, яка використовується при отриманні розчинів білків-антигенів, тілець-включень, контролів та кон'югатів, повинна бути використана не пізніше 18 годин з моменту отримання. Для решти виробничих процесів термін зберігання води не більше 3 діб.

ДР 3. Приготування поживного середовища

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

Для культивування штаму використовується середовище Н15
модифіковане (г/л):

- Гідролізат казеїну – 6г;
- Пептон казеїну – 6 г;
- Дріжджовий екстракт – 6 г;
- Глюкоза – 8г;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 15г;
- KH_2PO_4 – 3 г;
- NH_4Cl – 1 г;
- NaCl – 0,5 г;
- MgSO_4 – 0,3 г;
- Ампіциліну натрієва сіль — 0,2 мг;
- MnCl_2 – 0,15г;
- ZnCl_2 – 0,1 г;
- CaCl_2 – 0,1 г.

Для підготовки посівного матеріалу використовують середовище М9
модифіковане (г/л):

- Триптон — 10г;
- Дріжджовий екстракт — 5г;
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 6г;
- Глюкоза – 5г;
- KH_2PO_4 – 3 г;
- NH_4Cl – 1 г;
- NaCl – 0,5 г;
- 1М MgSO_4 – 2 мл;
- Ампіциліну натрієва сіль — 0,2 мг;
- 1М CaCl_2 – 0,1 мл.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Наважки зважують на вагах, розсипають у колби в наступній компоновці: гірдолізат казеїну та пептон казеїну (разом), дріжджовий екстракт, глюкоза, солі

буферного розчину: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4Cl , NaCl ; інші солі автоклавуються окремо: MgSO_4 , MnCl_2 , FeCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 .

Колби закривають ватно-марлевими пробками, задля запобігання випадання, пробки накривають папером, обв'язують шпагатом.

Термостабільні компоненти (солі, гідролізат казеїну, пептон казеїну) автоклавують при 0,2атм протягом години. Термолабільні компоненти автоклавують при 0,2атм протягом 30хв. Термін придатності стерильних розчинів — 1 доба. При $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ — 7 діб.

Після стерилізації розчини зливаються в реактор, де доводиться стерильною водою, перемішується та термостатується до необхідної температури.

Для корекції показника рН готують 40% розчин лугу: 400г NaOH + 600г деіонізованої води.

ДР 4. Підготовка посівного матеріалу

ДР 4.1 Відновлення музейної культури

Музейну культуру, що зберігається в морозильній камері при -70°C дістають і розморожують на повітрі при 20°C . Культуру вносять в колбу з 50 см^3 поживного середовища М9 модифікованого. Культивують на колбі-качалці за температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ до оптичної густини $D_{540} = 0,6$ оптичних одиниць. Отриману культуру вносять в колбу з 450 см^3 поживного середовища М9 модифікованого. Культивують за тих же умов.

В отриманій культурі перевіряють мікробіологічну чистоту та морфолого-фізіологічні особливості.

ДР 4.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

В інокулятор на 16л вносять поживне середовище і вносять посівний матеріал, отриманий на стадії ТП 5.1 (коефіцієнт заповнення 0,31). Культуру

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

культивують протягом 12 годин при 37 ± 1 °C $n = 145$ об/хв, аерації $V_{\text{пов}} = 3$ л/хв.

ТП 5. Виробниче культивування

Ферментер на 160 л заповнюють поживним середовищем H15, модифікованим. Коефіцієнт заповнення 0,3. Низький коефіцієнт заповнення пояснюється сильним піноутворенням і неможливістю додавати піногасник без впливу на цільовий продукт. Вносять посівний матеріал отриманий на стадії 5.2. Культивують при $t = 36 \pm 1$ °C, при режимі аерації 7л/хв.

Для контролю кожні 40-60 хв відбирають проби (по 3 мл). Значення рН коригується 40% розчином лугу, підтримується в межах оптимуму для білка, але не поза межами оптимуму *E. coli* 7,0-7,4. Оптичну густину вимірюють при довжині хвилі $\lambda = 540$ нм. Проводять мікроскопіювання для спостереження за можливою контамінацією та можливим “протіканням”.

Коли культура почне сягати середини експоненційної фази росту, оптична густина $D_{540} = 0,4-0,8$ о.о., необхідно провести хімічну індукцію. Для проведення хімічної індукції вносять розчин ІПТГ, кінцева концентрація ІПТГ в середовищі - 0,3мМ (3,43 г на 48л) і розчин ампіциліну натрієвої солі з розрахунку 0,25 г/л. Після проведення індукції продовжують проводити контроль оптичної густини, значення рН, проводити мікроскопіювання. Характерними ознаками завершення біосинтезу білка є поява в клітинах тілець-включень (спостерігається при мікроскопіюванні), спинення закислення середовища. Найбільш оптимальний час біосинтезу після проведення індукції — 3 години.

ТП 6. Відокремлення біомаси

Після завершення біосинтезу біомасу розливають в великі центрифужні стакани. Стакани врівноважують з точністю до 2г. Центрифугують 20 хвилин при швидкості 3000 об/хв. Після центрифугування фугат направляють на стадію 3В 12, а біомасу переносять до зіп-пакетів чистим шпателем. Стакани наповнюють культуральною рідиною, процес повторюється до повного спрацювання культуральної рідини. Біомасу зважують враховуючи вагу

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пакетів. Пакети додатково захищають, помішуючи у металізовані пакети, які запаюються і маркуються етикеткою, на якій нанесена назва штаму, серія біомаси, маса біомаси, прізвище лаборанта, відповідального за біосинтез. Пакет зберігають в морозильній камері при температурі $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ до появи потреби в спрацюванні біомаси.

ТП 7. Виділення та очистка тілець-включень з біомаси

ТП7.1 Відмивка і зважування біомаси

У попередньо зважені стакани вносять заморожену біомасу з однієї серії, її ресуспендують розчином для промивання клітин наступного складу: Трис-НСІ - 50 мМ; Na_2 -ЕДТА - 7 мМ; вода деіонізована - до 1 л. Суспензію розливають у вже зважені центрифужні стакани, врівноважують і центрифугують у режимі: 11000 об/хв, 20 хвилин, 4°C . Супернатант на знешкодження. Дану процедуру повторюють тричі. Повторно зважують стакани і по різниці ваги визначають вагу чистої біомаси.

ТП 7.2 Лізис біомаси

В цей же стакан з відмитою біомасою вносять буфер для лізису наступного складу:

- 100 мМ Tris-НСІ (рН 8);
- 100 мМ NaCl;
- 1.0 мМ PMSF (фенілметилсульфоніл);

Ретельно ресуспендують за допомогою механічного гомогенізатора.

На аналітичних вагах роблять наважку сухого лізоциму, який розводять водою (1 мл води на 50мг лізоциму). У отриману суспензію вносять розчин лізоциму з розрахунку 120мг сухого лізоциму на 100г біомаси. Суспензію ретельно перемішують, верх стакана закривають широкою смугою парафілму. Залишають на 2,5-3,5 години при температурі $22-25^{\circ}\text{C}$. В'язкість суспензії має зрости.

ТП 7.3 Обробка перепадом температур

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Отриману в'язку суміш заморожують при -20°C (12-16год) в морозильній камері і розморожують при +25°C на водяній бані. Тричі повторюють дану стадію.

ТП 7.4 Обробка ДНКзою

В отриману суміш вносять комерційний розчин ДНКази з розрахунку 1мл на 100г біомаси. Вносять 2М розчин сульфату магнію: 6мл на 100г біомаси. Залишають на 2,5-3,5 години при температурі +22- +25 °C. В'язкість суспензії має значно зменшитись.

ТП 7.5 Обробка ультразвуком

Для більш повної руйнації клітин продуцента використовують звуковий дезінтегратор. У пластиковий стакан вносять 180-200мл суспензії від ТП8.4. Стакан з суспензією ставлять на водяну баню з льодом для запобігання тепловій денатурації. Суспензію обробляють в наступному режимі: 3 імпульси по 20с, інтервал між імпульсами 30с. Після кожного імпульсу біомасу перемішують склянною паличкою. Дану стадію повторюють до повного спрацювання суспензії від ТП 8.4.

ТП 7.6 Відмивка

Суспензію від ТП 8.5 розливають у центрифужні стакани , які врівноважують з точністю до 0,01г. Центрифугують при швидкості 11000об/хв, 25хв. Температуру в центрифугузі виставляють на 10 °C. Супернатант до 3В 12. Осад, переносять в один стакан і ресуспендують за допомогою мехнічного гомогенізатора у розчині для відмивки. Склад розчину для відмивки (рН=8,0)

- 2М карбамід
- 50мМ Tris-HCl
- 1 мМ EDTA

Суспензію розливають по стаканах і знову центрифугують. Даний цикл повторюють тричі.

ТП 8. Хроматографічна очистка цільового білку

ТП 8.1 Переведення тілець-включень в розчинний стан

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розчин з відмитими тільцями-включеннями центрифугують при швидкості 11000об/хв, 25хв. Температуру в центрифугі виставляють на +10 °С. Супернатант до ЗВ 12. Осад переводять в розчинний стан, вносячи в розчин наступного складу:

- 8 М карбамід;
- 50 мМ Tris-HCl;
- 10 мМ реагент Келланда;
- 1 мМ EDTA.

Осад ресуспендують. Інкубують 2 години при температурі +20 °С і 16 годин при температурі +4°С.

Отриману суспензію центрифугують при 11000 об/хв 20хв. Температура всередині центрифуги +4°С. Осад до стадії ЗВ 12. Супернатант переливають в чисту ємність необхідного об'єму.

ТП 8.2 Підготовчі роботи

Готують буфери для проведення хроматографії. Буфер для промивки: 20мМ Tris-HCl, рН 7,4. Буфер для елюції: 20мМ Tris-HCl + 1М NaCl, рН 7,4. Буфер для гель-фільтрації: NaCl (136,9мМ) 8,00г + KCl (2,67мМ) 0,20г + Na₂HPO₄ (8,1мМ) 1,15г + KH₂PO₄ (1,47мМ) 0,20г + NaOH(до рН 7,4).

Проводять розрахунки необхідної кількості сорбенту. Колонку з Q-сефарозою, з Sephadex G50 та Mono Q колонку промивають буфером для промивки.

ТП 8.3 Очистка з низькою роздільною здатністю

Матеріал наносять на колонку (Q Sepharose Fast Flow) зі швидкістю 5 мл/хв. Після нанесення матеріалу колонку промивають п'ятьма об'ємами буферу для промивки, після чого елюють градієнтом розчину для елюції. Фракцію елюату, що містить р24 визначають використовуючи електрофорез (використовується 12% поліакриламідний гель).

ТП 8.4 Очистка з високою роздільною здатністю

Необхідну фракцію десятикратно розводять деіонізованою водою і наносять на аніонбмінну колонку високої роздільної здатності (Mono Q

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

colum HR 10/10) зі швидкістю 2 мл/хв. Після чого колонку промивають п'ятьма об'ємами буферу для промивки та елюють градієнтом буферу для елюції.

ТП 8.5 Гель-фільтрація

Отриманий розчин білка очищають на колонці для гелю фільтрації(Sephadex G50) зі швидкістю потоку 2мл/хв, змиваючи фосфатним буфером (PBS pH 7,4), що містить 0,148M NaCl, доводячи концентрацію білка до 1мг/мл.

Хроматографічні колонки за можливості регенерують і консервують.

ТП 9. Фасування розчиненого білку у флакони

Розчин цільового білка розливають у пластикові флакони за допомогою повірених автоматичних піпеток з використанням одноразових наконечників та ін. обладнання. Флакони закривають пластиковими кришками та герметизують парафіном.

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

На флакони наклеюють етикетки-самоклейки розміром 20×30мм. На етикетку перед поклейкою наносять за допомогою принтера українською та англійською мовами:

- країна виробник;
- підприємство-виробник;
- товарний знак виробника;
- адреса виробника;
- назва компонента з позначкою “in vitro”;
- концентрація;
- об'єм;
- термін придатності;
- номер серії;
- умови зберігання.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

Герметизовані та промарковані флакони укладають у відповідні отвори в полістирольних вкладках, які вкладають в коробки, збоку кладеться лист-вкладка. Коробки заклеюють та відправляють на склад для подальшого використання або ж збуту.

ПВ 11. Переробка відходів

Виробництво використовує матеріали та речовини, що можуть бути регенеровані. Це фільтрувальні матеріали, сорбенти, водяна пара, органічні розчинники, тощо.

Регенерація фільтрів, що використовуються при підготовці води та повітря, проводиться наступним чином: їх вимочують в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

Сорбенти регенерують наступним чином: через колонку пропускають п'ятикратний об'єм розчину для промивки, потім через колонку пропускають п'ятикратний об'єм розчину для елюції і знову п'ятикратний об'єм розчину для промивки. Колонку консервують, використовуючи азид натрію.

ЗВ 12. Знешкодження відходів

ЗВ 12.1 Знешкодження відпрацьованих поживних середовищ

Відпрацьоване поживне середовище зливають в бутелі об'ємом 20 л і стерилізують в автоклаві при $(1,0 \pm 0,05)$ атм. протягом 40 хвилин, охолоджують до 20-30 °С, після чого зливають в каналізацію. Чашки Петрі з відпрацьованими агаризованими середовищами розміщують у металевому біксі і стерилізують в автоклаві при $(1,0 \pm 0,05)$ атм. протягом 40 хвилин. Чашки Петрі охолоджують до +20-+30 °С і вичищають з них агаризовані середовища у відвал.

ЗВ 12.2 Нейтралізація кислотних і лужних стоків

Відроблену хромову суміш зі стадії ДР1.3 нейтралізують гідроокисом натрію до рН 6-7. Показник контролюють лакмусовим папером. Після чого порційно зливають в міську каналізацію під проточною водою. Кислоти і

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

луги нейтралізуються згідно інструкцій і порційно зливаються в каналізацію під проточною водою.

ЗВ 12.3 Знешкодження потенційно інфекційних відходів

1. Тверді відходи (вата, фільтри, рукавички, наконечники для піпеток та ін.) - розміщують у спеціально маркованих біксах, які підлягають автоклавуванню при надлишковому тиску 0,1 мПа протягом 60 хвилин. Після знешкодження тверді відходи направляються на завод “Енергія” для спалення.

2. Рідкі відходи зливають у спеціальні марковані ємності з кришками, що містять 1/3 об’єму 2% розчину лізоформіну, та витримують не менше 2 годин. Загальний об’єм відходів, що зливаються у ємність, не повинен перевищувати 1/3 об’єму ємності. Заповнену ємність переносять у спеціально відведене приміщення, де відходи підлягають додатковій обробці хлорним вапном. Після заповнення ємності на 2/3 об’єму, її герметично закривають кришкою та спецтранспортом направляється на завод “Енергія” для спалення.

ЗВ12.4 Розбавлення та злив нетоксичних та малотоксичних відходів розчинів

Рідини, які не містять токсичних речовин і не мають потенційно-інфекційної небезпеки, розводять водопровідною водою нижче показника ГДК перед зливом у міську каналізацію.

ЗВ 12.5 Утилізація нешкідливих твердих відходів

Тверді нешкідливі відходи зі всіх стадій виробництва збирають у поліетиленові мішки та спецтранспортом вивозять на міське звалище.

4.4. Матеріальний баланс

Таблиця 4.4.1 Матеріальний баланс виробництва

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						74
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт/уп	л		кг	шт/уп	л
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДРЗ							
Гідролізат казеїну	0,264			Поживне середовище Н15			44
Пептон казеїну	0,264			Поживне середовище М9			5
Дріжджовий екстракт	0,289			40% р-н NaOH	0,25		0,175
Глюкоза	0,382			Відходи	0,1	21	2,5085
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,69						
KH ₂ PO ₄	0,147						
NH ₄ Cl	0,049						
NaCl	0,0245						
MgSO ₄	0,0132						
Ампіциліну натрієва сіль	0,01						
MnCl ₂	0,0066						
ZnCl ₂	0,0044						
CaCl ₂	0,0044						
Триптон	0,05						
1М MgSO ₄			0,01				
1М CaCl ₂			0,0005				
NaOH	0,1						
Вода деіонізована			49,15				
Спирт етиловий			0,3				
Ампула пластикова		1					
Рукавички хірургічні гумові		6					

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

Комплект одягу для чистих приміщень		1					
Колба термостійка		12					
Вата	0,1						
Окуляри захисні		1					
Всього:	2,398	21	49,4605	Всього:	0,35	21	51,5085
	72,8585				72,8585		

Стадія ДР4

Поживне середовище			5	Посівний матеріал			5
Аліквота зі штамом			0,005	Відходи	0,105	8	0,525
40% р-н NaOH			0,02				
Перекис водню 3%			0,1				
Спирт етиловий 70%			0,3				
АХД			0,125				
Марля медична		1					
Рукавички хірургічні		6					
Папір фільтрувальний		1					
Вата медична	0,1						
Всього:	0,1	8	5,55	Всього:	0,105	8	5,545
	13,65				13,65		

Стадія ТП 5

Поживне середовище від ДР3			44	Культуральна рідина			46,697
Посівний матеріал ДР4			5	Втрати з виносом повітря 5%			2,458

NaOH			0,155	Відходи	0,2	18	1,2 9
Ампіциліну натрієва сіль	0,012						
ПТГ	0,00343						
Вода стерильна			0,05				
Перекис водню 3%			0,1				
Спирт етиловий 70%			1				
АХД			0,125				
Марля медична		3					
Рукавички хірургічн		10					
Папір фільтрувальний		5					
Вата медична	0,2						
Всього:	0,21543	18	50,43		0,2	18	50, 445
	68,645				68,645		
Стадія ТП 6							
Культуральна рідина	46,697			Біомаса	0,397		
				Фугат			46, 3
Всього:	46,697			Всього:			
	46,697				46,697		
Стадія ТП 7							
Розчин для промивання біомаси			4	Розчин тілець включеннь			0,5
Розчин для лізису бактеріальних клітин			0,8	Відходи		4	7,3 285
Лізоцим	0,0005						

2М розчин MgSO ₄			0,024				
Розчин ДНК-ази			0,004				
Скляна паличка		4					
Розчин для відмивки			3				
Всього:	0,00048	4	7,828	Всього:		4	7,8 285
	11,8285				11,8285		

Стадія ТП 8

Розчин тілець включень			0,5	Розчин білку з концентрацією 2мг/мл			0,3 8
Розчин для розчинення тілець включень			0,5	Втрати під час технологічних операцій 5%			0,0 2
Деіонізована Н ₂ О			5	Відходи			13, 2
Розчин ФМСФ			0,1				
Буфер для промивки			5				
Буфер для елюції			1				
PBS pH 7,4			1				
Розчин NaOH, 2 М			0,5				
Всього:			13,6	Всього:			13, 6
	13,6				13,6		

Стадія ТП 9

Пластикові ампули з кришечками		380		Запакований розчин антигену		372	0,372 0
Розчин білку з концентрацією 2мг/мл			0,38	Втрати (2%)			0,007 6
Наконечники		380		Брак		16	0,000

						4
Парафілм		1		Відходи	373	
Всього:		761	0,38	Всього:		0,38
	761,038				761,038	

4.5 Контроль виробництва

Таблиця 4.5.1 Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.1.1 Забір повітря Кт1.1.1.1	Повітря, що надходить з атмосфери Приблтна кількість частинок в м ³	Пропускна здатність повітрязабірника	Для кожної операції	[x]=2000 частинок/м ³
ДР 1.1.2 Попередня очистка повітря Кт 1.1.2.1	Ступінь чистоти повітря	Манометр	Для кожної операції	d _{пор} =5-10 мкм
ДР 1.1.3 Стабілізація повітря Кт 1.1.3.1	Температура, вологість	Термометр Вологомір	Беспосередньо під час нагрівання	t = 20 °C φ = 60%
ДР 1.1.4 Фільтрування через фільтри І ступеню Кт 1.1.4.1 Км 1.1.4.2	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Метод визначення мікробної контамінації (проба повітря КУО/м ³), Седиментаційний (седиментація на пластинку КУО/м ³)	Під час кожної зміни, під час виробничого біосинтезу	Не має життєздатних мікроорганізмів, та максимально допустиме число часток в 1м ³ повітря

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

				200. Е = 95 %
ДР 1.1.5 Фільтрування через фільтри II ступеню Кт 1.1.5.1 Км 1.1.5.2	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Часточки бруду; манометр	Безперервно при подачі повітря	Е = 99,99 %
ДР 1.2.1 Приготування розчину миючого засобу Кт 1.2.1.1	Миючий розчин, кількість миючого розчину	Ваги, мірний посуд, візуально	Для кожної операції	С = 5 %
ДР 1.2.2 Приготування розчину перекису водню 3% Кт 1.2.2.1	Перекис водню, кількість перекису водню	Ваги, мірний посуд, фізичні методи визначення концентрації	Для кожної операції	С = 3 %
ДР 1.2.3 Приготування розчину етилового спирту 70% Кт 1.2.3.1	Етиловий спирт, кількість, етилового спирту	Ваги, мірний посуд, фізичні методи визначення концентрації	Для кожної операції	С = 70 %
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Кмб 1.3.1	Кількість мікроорганізмів	Змиви з поверхонь	Після підготовки приміщень	Клас В: КУО < 10; Клас С: КУО < 100; Клас Д: КУО < 200.
ДР 1.4.1 Мийка і дезінфекція Кт 1.4.1.1 Кмб 1.4.1.2	Температура, мікробна контамінація	Термометр, мікробіологічний метод, висіви на чашки Петрі	Під час виробничого процесу	КУО ≤ 2 τ = 30 хв
ДР 1.4.3 Стерилізація обладнання та посуду	Тиск, температура.	Манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Для кожної операції	t = 121 °C τ = 1 год

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

Кт 1.4.3.1 Кмб 1.4.3.2				
ДР 1.5 Підготовка одягу Кт 1.5.1	Тиск, температура.	Манометр технічний, термометр, термоіндикатор	Для кожної операції	$t = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 45\text{ хв}$
ДР 2 Підготовка води очищеної і деіонізованої Кт 2.1	Очищена вода Ступінь деіонізації	Індикаторне табло установки	Для кожної операції	0-15 МОм
ДР 3 Приготування поживного середовища Кт 3.1 Кмб 3.2 Кх 3.3	Режим стерилізації , мікробна контамінація, показник рН	Термометр Манометр Годинник рН-метр	Кожен цикл	0.1 МПа, $110\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30- 40 хв Не має життєздатних мікроорганізмів рН 7,4
ДР 4.1 Відновлення музейної культури Кт 4.1.1 Кмб 4.1.2 Кх 4.1.3	Фізіолого- морфологічний стан культури та генетичні особливості штаму, температура, показник рН	Мікроскопіювання, Мікробіологічна чистота, електрофорез на цільовий білок, рН- метр	Для кожної операції	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ рН 7,4
ДР 4.2 Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Температура, рН, відсутність контамінації	Термометр, рН-метр, мікроскоп	Для кожної операції	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН=7,0-7,4, Не має життєздатних мікроорганізмів

Кт 4.2.1 Кмб 4.2.2 Кх 4.2.3				
ТП 5 Виробниче культивування Кт 5.1 Кмб 5.2 Кх 5.3	Температура, рН, відсутність контамінації, оптична густина, аерація	Термометр, рН-метр, мікроскоп, мікрокалориметр	Для кожної операції	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,0\text{-}7,4$, $\tau = 8\text{ год}$, Аерація = $0,006\text{ м}^3/\text{год}$
ТП 6 Відокремлення біомаси Кт 6.1	Швидкість осадження клітин, Час осадження клітин	Табло центрифуги, візуально, годинник	Для кожної операції	$\tau=20\text{ хв}$, $n=3000\text{ об/хв}$
ТП7.1 Відмивка і зважування біомаси Кт 7.1.1	Біомаса	Ваги, мірний посуд, візуально, Табло центрифуги	Для кожної операції	$t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$, $n=11000\text{ об/хв}$
ТП 7.2 Лізис біомаси Кт 7.2.1	Біомаса	Ваги, мірний посуд, візуально, табло центрифуги, табло холодильника	Для кожної операції	$\tau = 10\text{ хв}$, $n=5000\text{ об/хв}$, $t = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$,
ТП 7.3 Обробка перепадом температур Кт 7.3.1	Температура	Термометр	Для кожної операції	$T_{\text{зам}} = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T_{\text{від-ня}} = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$
ТП 7.4 Обробка	Лізована біомаса	візуально	Для кожної операціїД	Відсутність тягучості розчину

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		82

ДНКзою Кт 7.4.1			ля кожної операції	
ТП 7.5 Обробка ультразвуком Кт 7.5.1	Суспензія	Табло дезинтегратора	Для кожної операції	$\tau = 1$ хв, $t=0^{\circ}\text{C}$, $v= 20$ кГц
ТП 7.6 Відмивка Кт 7.6.1	Суспензія	Табло центрифуги, оптична густина	Для кожної операції	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ хв, $n=11000$ об/хв, $D =0,2$ ОО
ТП 8.1 Переведення тілець- включень в розчинний стан Кт 8.1.1	Осад	Табло центрифуги, ваги, мірний посуд, візуально	Для кожної операції	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 25$ хв, $n=11000$ об/хв
ТП 8.2 Підготовчі роботи Кт 8.2.1	Реагенти, сорбенти, кількість реагентів, кількість сорбенту	Ваги, мірний посуд, візуально	Для кожної операції	-
ТП 8.3 Очистка з низькою роздільною здатністю Кт 8.3.1	Швидкість потoku, оптична густина елюату, фракції.	Хроматограф, електрофорез	Для кожної операції	5мл/хв 23-26кДа
ТП 8.4 Очистка з	Швидкість потoku, оптична густина	Хроматограф	Для кожної операції	2мл/хв

високою роздільною здатністю Кт 8.4.1	елюату			
ТП 8.5 Гель-фільтрація Кт 8.5.1	Швидкість потoku, оптична густина елюату	Хроматограф	Для кожної операції	2мл/хв
ТП 9 Фасування розчиненого білку у флакони Кт 9.1	Фасовані флакони	відкаліброваної автоматичної піпетки або відкаліброваного мірного циліндра	Для кожної операції	$V < 2,0$ мл: $V_{\text{в ампулі}} = V + 0,01$ мл

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на листі формату А1.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Для культивування *E. coli Rosetta(DE)pLysS* з метою отримання рекомбінантного білка р24 ВІЛ було обрано глибинний спосіб.

Для забезпечення необхідної якості продукції і високого виходу цільового білку необхідно створити наступні умови:

- температура процесу $36 \pm 1^\circ\text{C}$;
- перемішування не менше 60 об/хв;
- герметичність процесу;
- аерація 7 л/хв;

Ферментери, що використовуються для проведення глибинного культивування можна умовно поділити на групи за такими ознаками:

- спосіб підводу енергії: до газової фази, до рідкої фази, комбіновані;
- стерильність: герметичні, ті що не забезпечують стерильність;
- спосіб культивування: безперервний, періодичний;
- конструктивні ознаки: з турбіною та дифузором, з механічними мішалками, з рухомими аераторами, з ежекційною системою аерації.

Найпопулярнішою є класифікація за способом підводу енергії до середовища для його гомогенізації та проведення масообмінних та теплових процесів.

Для забезпечення гомогенізації середовища під час процесу здійснюють перемішування одним із трьох способів введення енергії або їх комбінацією:

- газом під тиском;
- потоком рідини (циркуляцією рідини);

					ДП 6203. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Власенко Д.В.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	85
						Аркушів	
						110	
Керівник		Литвинов Г.С.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

- за допомогою механічних перемішуючих пристроїв;

За вказаними вище ознаками нам необхідний апарат з комбінованою подачею енергії (так як необхідна аерація і високий ступінь гомогенізації), герметичний, для періодичного способу культивування, з механічною мішалкою і барботером.

Ферментер з механічним перемішуючим пристроєм і барботером є типовим і здатен забезпечити необхідні нам умови культивування. Даний тип апарату широко використовується для проведення асептичних процесів вирощування мікроорганізмів.

В даній конструкції мішалка є основним елементом перемішуючого пристрою. Традиційними для біотехнологічних процесів використовуються такі мішалки: турбіні, лопатеві, гвинтові. Ці мішалки є ефективними при в'язкості рідини не більше 50 Па·с.

Враховуючи наш низький коефіцієнт заповнення можемо стверджувати, що нам необхідна мішалка яка може створювати якісні радіальні потоки. З таким завданням добре справиться відкрита турбінна мішалка [54 - 55].

Для приведення мішалки в рух використовується електропривід який встановлюється на кришці або під днищем апарату. Для забезпечення герметичності апарату вихід валу приводу з апарата є ущільненим. Ущільнення провадиться різними методами, вибір яких залежить від надлишкового тиску в апараті, необхідного рівня герметичності та ін. умов.

Типовим рішенням для культивування мікроорганізмів є використання вертикального виносного приводу з торцевим ущільненням. Доцільним є вибір торцевого ущільнення типу ТСК, для ущільнення вертикальних валів зі сталі Х18Н10Т, кільця з гуми ІРР-1225, діаметр валу, що ущільнюється – 30-140 мм.

Для забезпечення достатньою концентрацією кисню продуценту газ, що вносять в середовище диспергують за допомогою первинного та вторинного диспергатору. Для первинної диспергації використовується барботер, для вторинної диспергації – мішалка.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		86

Для подачі стерильного повітря, пари для стерилізації, підготовленої води, поживного середовища, посівного матеріалу, миючих засобів на кришці ферментеру передбачено штуцери.

Для зливу рідини на днищі ферментера передбачено штуцер.

Для подачі теплоносіїв, на рубашці ферментера передбачені штуцери на вхід і на вихід.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Апарат призначений для культивування бактерій *E.colli Rosetta (DE) LysS*

1. Номінальний об'єм апарата, м ³	0,16;
2. Коефіцієнт заповнення	0,3;
3. Площа поверхні теплообміну рубашки, м ²	0,9;
4. Тиск, МПа:	
в апараті	0,13;
в сорочці	0,3;
5. Температура, °C	
робочого середовища	36;
6. Тип перемішуючого пристрою – турбінна мішалка	
кількість мішалок	1;
частота обертання валу мішалки, с ⁻¹	2;
потужність приводу, Вт	75;
7. Габаритні розміри:	
- довжина	770 мм;
- ширина	724 мм;
- висота	1,45 м;
8. Маса	440 кг

Визначення теплофізичних властивостей середовища

Теплофізичні властивості за визначальної температури – $t_{кр}=36^{\circ}\text{C}$.

Густина поживного середовища:

$$\rho_c = 1050(\text{кг/м}^3)$$

Коефіцієнт динамічної в'язкості поживного середовища:

$$\mu_c = 1,55 \cdot 10^{-3}(\text{Па} \cdot \text{с})$$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості розчину поживного:

$$\nu_c = \frac{\mu_c}{\rho_c} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3}}{1050} = 1,45 \cdot 10^{-6}(\text{м}^2/\text{с})$$

Теплоємність розчину поживного:

$$C_c = 3,820(\text{кДж/кг} \cdot \text{К})$$

Коефіцієнт теплопровідності розчину поживного середовища:

$$\lambda_c = 0,545[56]$$

Теплофізичних властивості сплаву:

Густина сплаву змішувача:

$$\rho_{сп} = 7850(\text{кг/м}^3)$$

Теплоємність сплаву змішувача:

$$c_{сп} = 0,5 (\text{кДж/кг} \cdot \text{К}).$$

Конструктивний розрахунок

Метою розрахунку є визначення розмірів виробничого ферментера та його конструктивних елементів.

Визначаємо робочий об'єм апарата :

$$V_p = V_n \cdot K_z$$

$$V_p = 0,16 \cdot 0,3 = 0,048(\text{м}^3)$$

Відповідно до ГОСТ 20680–86 [57], було обрано конструкцію з еліптичним днищем та плоскою знімною кришкою (тип 4).

Відповідно до цього, внутрішній діаметр апарата (D) дорівнює 600 мм = 0,6м

За ГОСТ 6533–78 параметри еліптичного днища [58]

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

Внутрішній діаметр відбортюваної частини: $D_v = 600 \text{ мм}$

Внутрішня поверхня еліптичного днища : $F_{\text{дн.}} = 0,44 \text{ м}^2$

Висота відбортюваної частини : $h_1 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м}$

Товщина стінки днища : $s = 6 \text{ мм} = 0,006 \text{ м}$

Об'єм еліптичного днища : $V_{\text{дн}} = 35,2 \text{ дм}^3 = 0,0352 \text{ м}^3$

Висота апарата : $H = 625 \text{ мм} = 0,625 \text{ м}$

Площа поверхні теплообміну рубашки : $F_p = 0,9 \text{ м}^2$

Маса днища : $m = 35,6 \text{ кг}$

Висота еліптичного днища за ГОСТ 6533-78 для апарата вказаного діаметра розраховується як :

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D$$
$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 0,6 = 0,15(\text{м})$$

Таким чином, визначаємо повну висоту днища апарату :

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{ел.дн}} = 0,025 + 0,15 = 0,175 \text{ м}$$

Далі визначаємо об'єм циліндричної частини ферментера :

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - V_{\text{дн}}$$
$$V_{\text{ц}} = 0,16 - 0,0352 = 0,1248 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини ферментера :

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{0,1248 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,6^2} = 0,4416(\text{м})$$

Загальна висота апарату:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + h_{\text{дн}}$$
$$H_{\text{заг}} = 0,4416 + 0,175 = 0,6166 \text{ м}$$

Висота рівня рідини в середовищі визначається за формулою :

$$H_p = \frac{4(V_p - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн}}$$
$$H_p = \frac{4(0,048 - 0,0352)}{\pi \cdot 0,6^2} + 0,175 = 0,22 \text{ м}$$

Розрахунок механічного перемішуючого пристрою

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для перемішування середовища в реакторі обираємо відкриту турбінну мішалку ГОСТ 20680-75:

$$\frac{D}{4} : \frac{D}{3} = \frac{0,6}{4} : \frac{0,6}{3}$$

Серед вирахованого діапазону значень (0,15 ÷ 0,2) обираємо стандартний діаметр мішалки

$$d_m = 160 \text{ мм}$$

$$\text{Висота перемішуючого пристрою : } h_m = 0,2 \cdot d_m = 0,2 \cdot 0,16 = 0,32 \text{ м}$$

$$\text{Ширина лопаті мішалки: } l_l = 0,25 \cdot d_m = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м}$$

$$\text{Висота розміщення мішалки : } h = 0,4 \cdot d_m = 0,6 \cdot 0,16 = 0,096 \text{ м}$$

$$\text{Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки: } \xi_m = 8,4$$

Число обертів мішалки згідно з обраною технологією – 120 об/хв

$$n = 120 \text{ об/хв} = 2 \text{ об/с}$$

Діаметр вала мішалки:

$$d_b = C \cdot d_m$$

де $C = 0,117$ – для турбінної мішалки

$$d_b = 0,117 \cdot 0,16 = 0,01872 \text{ м}$$

Розрахунок глибини воронки

Визначаємо параметр висоти завантаження апарата – γ за формулою

$$\gamma = 8 \frac{H_p}{D} + 1$$

$$\gamma = 8 \cdot \frac{0,22}{0,6} + 1 = 3,93$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E розраховуємо з формули :

$$E = \frac{\gamma}{\xi_m z_m R_{\text{ц}}^{0,25}}$$

$$E = \frac{3,93}{8,4 \cdot 1 \cdot (4,24 \cdot 10^4)^{0,25}} = 0,0326$$

Центробіжний критерій Рейнольдса:

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

$$\Re_{\text{ц}} = \frac{n \cdot d_{\text{м}}^2}{v_{\text{с}}};$$

$$\Re_{\text{ц}} = \frac{2,4 \cdot 0,16^2}{1,45 \cdot 10^{-6}} = 4,24 \cdot 10^4.$$

За знайденим параметром відповідно до графіка визначаємо параметр розподілення швидкості ψ_1 :

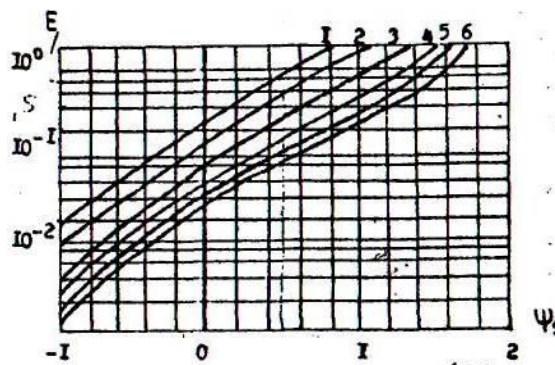


Рис.2.1. Параметр розподілення швидкості $\psi=f(E)$ для мішалок: трьохлопастної (01), турбінна відкритої (03), шестилопастної (05), лопастної (07), емальований лопастних, фрезерної та пропелерної при $z_D \geq 1,5$

Рис. Параметр розподілу швидкості для мішалок: трьохлопастної (01) турбінної відкритої (03), шестилопастної (05), лопастної (07), емальованої лопастної, фрезерної та пропелерної при z_D більше-рівне 1,5

$$\psi_1 = -0,5,$$

тоді параметр глибини воронки B дорівнює :

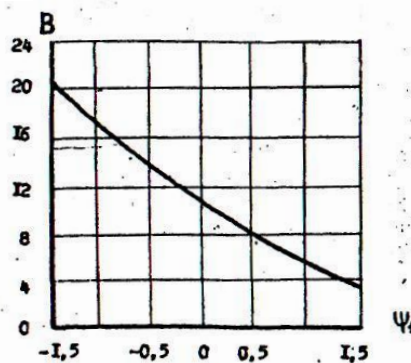


Рис.2.5. Параметр глибини воронки $B=f(\psi_1)$

$$B = 13$$

Знаходимо глибину воронки за формулою :

$$h_{\text{в}} = \frac{Bn^2d_{\text{м}}^2}{2}$$

$$h_{\text{в}} = \frac{13 \cdot 2,4^2 \cdot 0,16^2}{2} = 0,958\text{м}$$

Гранично допустима глибина воронки :

$$h_{\text{гр}} = H_{\text{р}} - h = 0,22 - 0,064 = 0,156\text{м}$$

Перевіряємо співвідношення : $h_{\text{в}} > h_{\text{гр}}$

$0,958 > 0,156$, отже, у такому випадку, встановлюються перегородки.

Розрахунок барботера

Висота перемішуючого пристрою над барботером становить:

$$h_{\delta} = 0,25d_{\text{м}}$$

$$h_{\delta} = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04\text{м.}$$

Діаметр барботеру знаходимо зі співвідношення :

$$D_{\delta} = (0,5 \div 0,75)d_{\text{м}}$$

$$D_{\delta} = 0,75 \cdot 0,16 = 0,12\text{м}$$

Діаметр отворів барботеру:

$$d_0 = 2\text{мм} = 0,002\text{м}$$

Кількість отворів в барботері:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_{\text{г}}}{\pi d_0^2 W_0},$$

де $V_{\text{г}} = 0,005 \text{ м}^3/\text{с}$.

Приймаємо $W_0 = 20 \text{ м/с}$, тоді:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 0,005}{3,14 \cdot 0,002^2 \cdot 20} = 48 \text{отворів}$$

Відстань між отворами:

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

$$t_{\text{отв}} = \frac{\pi D_{\text{б}}}{z_{\text{отв}}},$$

$$t_{\text{отв}} = \frac{3,14 \cdot 0,12}{48} = 0,008 \text{ м}$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} d_0^2 \cdot z_{\text{отв}};$$

$$S_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,002^2 \cdot 48 = 1,51 \cdot 10^{-4} (\text{м}^2).$$

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність, що витрачається на перемішування визначають за формулою:

$$N_{\text{м}} = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_{\text{м}}^5;$$

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса:

$$\Re_{\text{ц}} = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_{\text{м}}^2}{\mu_c};$$

$$\Re_{\text{ц}} = \frac{1050 \cdot 2,4 \cdot 0,16^2}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 41,62 \cdot 10^3.$$

Із графіка, $K_N = 8$ [59], тоді

$$N_{\text{м}} = 8 \cdot 1050 \cdot 2,4^3 \cdot 0,16^5 = 12,176 \text{ Вт}$$

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевих ущільненнях:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_{\text{в}}^{1,3} = 6020 \cdot 0,01872^{1,3} = 34,166 \text{ Вт}$$

Коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення:

$$k_n = H_p / D_{\text{вн}}$$

$$k_n = 0,22 / 0,6 = 0,367$$

Потужність електродвигуна:

$$N = \frac{k_{\text{п}} \cdot k_n \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta}$$

де $k_{\text{п}}$ – коефіцієнт, що враховує наявність внутрішніх пристроїв в апараті, для апаратів з перегородками, трубою передавлювання і гільзою для термометра $k_{\text{п}} = 1,8$.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						94
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$N = \frac{1,8 \cdot 0,367 \cdot 12,176 + 34,166}{0,65} = 65,6 \text{ Вт}$$

Обираємо стандартний двигун потужністю 75Вт

Тепловий розрахунок

Метою теплового розрахунку є визначення необхідної площі теплообміну та перевірка, чи забезпечить стандартна площа теплообміну сорочки ту кількість теплоти, яка необхідна для нагрівання, речовини.

Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу:

$$V_{\text{пс}} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 0,048 = 0,0432 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм}} = 0,1 \cdot V_p = 0,9 \cdot 0,048 = 0,0048 \text{ м}^3$$

Надходження енергії до ферментера відбувається з поживним середовищем, із посівним матеріалом, із повітрям, шляхом дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв та теплоти реакцій, що протікають у ферментері, таким чином, сумарна кількість надходжень теплоти має вигляд :

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}} + E_{\text{дис}_1} + E_p$$

Розрахуємо кожну складову

- Поживне середовище

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} \cdot C_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс}} = \rho_{\text{пс}} \cdot V_{\text{пс}} \cdot C_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс}}$$

$$E_{\text{пс}} = 1050 \cdot 0,0432 \cdot 3820 \cdot 36 = 6411,182 \text{ КДж}$$

- Посівний матеріал

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot V_{\text{пм}} \cdot C_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}}$$

$$E_{\text{пм}} = 1050 \cdot 0,0048 \cdot 36 \cdot 3820 = 712,354 \text{ КДж}$$

- З повітрям

$$E_{\text{пов}_1} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{пов}} \cdot \tau \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}}$$

$$E_{\text{пов}_1} = 1,1391 \cdot 0,005 \cdot 43200 \cdot 1005 \cdot 36 = 9149,205636 \text{ КДж}$$

- Теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв :

$$E_{\text{дис}} = N_m \cdot \tau_{\text{пр}};$$

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		95

$$E_{\text{дис}} = 12,176 \cdot 43200 = 526 \text{ КДж}$$

- теплота реакції, що протікає у ферментері:

$$E_p = m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}}$$

де $r_{\text{цук}} = 16,5 \text{ Мдж/кг}$

$$m_{\text{цук}} = 0,1 \cdot 0,9 \cdot V_p \cdot \rho_c;$$

$$m_{\text{ц}} = 0,1 \cdot 0,9 \cdot 0,048 \cdot 1050 = 4,536 \text{ кг}$$

$$E_p = 4,536 \cdot 16,5 \cdot 10^6 = 74,844 \text{ МДж}$$

Таким чином, сумарна кількість теплоти надходжень до ферментеру :

$$\sum E_{\text{надх}} = 6411,182 \cdot 10^3 + 712,354 \cdot 10^3 + 9149,2 \cdot 10^3 + 526 \cdot 10^3 + 74,844 \cdot 10^6 = 91,643 \text{ МДж}$$

Витрати теплової енергії відбуваються :

- з повітрям :

$$E_{\text{пов}_2} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c = \rho_{\text{пов}} \cdot V_g \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c;$$

$$E_{\text{пов}_2} = 1,1391 \cdot 0,005 \cdot 43200 \cdot 1005 \cdot 36 = 9149,206 \text{ КДж}$$

- З культуральною рідиною

$$E_{\text{к}_2} = 1050 \cdot 0,048 \cdot 3820 \cdot 36 = 7123,536 \text{ КДж}$$

- Втрати тепла в навколишнє середовище

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2});$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (7123,536 + 9149,206) = 325,455 \text{ КДж}$$

Таким чином, сума теплових витрат складає:

$$\sum E_{\text{втр}} = 7123,536 \cdot 10^3 + 9149,206 \cdot 10^3 + 325,455 \cdot 10^3 = 16598,197 \text{ КДж}$$

Розраховуємо теплове навантаження у ферментері:

$$E_T = 16598,197 - 91643 = - 75044,803 \text{ КДж}$$

Дані розрахунку свідчать про те, що в апараті відбувається нагрівання, тому для підтримання температури культивування необхідне охолодження.

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія. Оскільки відбувається процес охолодження, то:

$$t_T = t_p - \Delta t_{cp}$$

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		96

де $\Delta t_{cp}=10^{\circ}\text{C}$.

$$t_{\tau} = 36 - 10 = 26^{\circ}\text{C}$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі середовища в реакторі

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища в реакторі до стінки апарата або до змішувача, що визначається з рівняння:

$$Nu_1 = C \cdot Re_{\tau}^n \cdot Pr_1^{0,33} = 0,760 \cdot (41,62 \cdot 10^4)^{0,67} \cdot 10,86^{0,33} = 9717,84$$

Де коефіцієнти $C=0,760$, $n=0,67$ для апарату з сорочкою, перегородками та відкритою турбінною мішалкою.

Критерій Прандтля для середовища в апараті:

$$Pr_1 = \frac{\mu_1 \cdot C_{p1}}{\lambda_1} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3820}{0,545} = 10,86$$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища до стінки:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_1}{D} = \frac{9717,84 \cdot 0,545}{0,6} = 8827,038 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі теплоносія в сорочці

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці знаходять за рівнянням:

$$Nu_2 = C(Gr \cdot Pr)^n = 0,15(1,254 \cdot 10^9)^{0,33} = 150,84$$

де коефіцієнти $C = 0,15$ і $n=0,33$ знаходять в залежності від величини добутку $Gr \cdot Pr$:

у випадку, коли воду використовують як теплоносій:

$$Gr \cdot Pr = H_p^3 \cdot \Delta t_1 \cdot B = 0,22^3 \cdot 5 \cdot 23,55 \cdot 10^9 = 1,254 \cdot 10^9$$

Значення B для $27^{\circ}\text{C} = 23,55 \cdot 10^9$

$$\Delta t_1 \approx \frac{\Delta t_{cp}}{2} = \frac{10}{2} = 5$$

Коефіцієнт тепловіддачі для води у сорочці становить:

$$\alpha_2 = \frac{Nu_2 \cdot \lambda_2}{d} = \frac{150,84 \cdot 0,608}{0,062} = 1479,21 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}$$

де d — еквівалентний діаметр каналу сорочки.

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot a \cdot b}{a + b} = \frac{2 \cdot 0,044 \cdot 0,14}{0,044 + 0,14} = 0,067\text{м}$$

коефіцієнти: $b=0,14$, a :

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						97
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{cm} - D}{2} = \frac{0,7 - 2 \cdot 0,006 - 0,6}{2} = 0,044\text{м}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{8827,038} + \frac{0,006}{16} + \frac{1}{1479,21}} = 858,9 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2\text{К}}$$

Тоді поверхня теплообміну становить:

$$F = \frac{Q}{K \cdot \Delta t \cdot \tau} = \frac{75044,803 \cdot 10^3}{858,9 \cdot 10 \cdot 43200} = 0,202 \text{м}^2$$

Дійсна поверхня теплообміну сорочки становить 0,9 м².

$$F_p < F_d$$

$$0,202 \text{ м}^2 < 0,9 \text{ м}^2$$

Можна зробити висновок, що поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи[60].

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Обране загальнозаводське обладнання повинно відповідати вимогам, які забезпечують асептичність виробництва і високу якість продукції. Критичними для забезпечення необхідного рівня асептики є фільтри, вентиляційні системи, насоси.

Підготовка води здійснюється за використання системи для очищення води PURELAB Option-R60, яка постачає воду для роботи автоклавів, стерилізаторів, приготування буферних розчинів, розчинів для досліджень, поживного середовища. Дана система має продуктивність 60л/год.

Так як на даному біотехнологічному підприємстві наявні приміщення класів чистоти В, С, Д, то їх необхідно забезпечувати повітрям з відповідним ступенем чистоти. Для очистки можна використати фільтри другого ступеня очистки класу F7, та вискоелективні фільтри НЕРА Н13-14 (які забезпечують очистку від часток розміром до 3мкм). Для подачі повітря та

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

суміші газів можна використати радіальні вентилятори ВЦ 14 – 46 (ВР 280-46) – робоча температура $< +80^{\circ}\text{C}$; продуктивність $1,8 \cdot 10^4$ м³/год.

Для забезпечення аерації під час культивування, повітря додатково пропускають через індивідуальний фільтр ферментера ФТО, який має продуктивність 60 м³/год і ефективність очистки 99,99%.

Насоси які контактуватимуть з поживним середовищем і культуральною рідиною мають забезпечувати відсутність контамінації і унеможливлювати витік культуральної рідини у навколишнє середовище. Цим вимогам відповідають відцентрові герметичні насоси (ГОСТ 20791-83)[61]. Продуктивність 3 – 200 м³/год. Потужність 1,1 – 75 кВт. Температура рідини від - 40 – + 360^oC.

Для забезпечення перемішування можна використати асинхронний електродвигун з потужністю 0,075 кВт.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Охорона праці

У процесі виробництва використовуються горючі, вибухонебезпечні, шкідливі для здоров'я речовини. Використовуються механічна, електрична, теплова енергія, вакуум. Використовуються апарати, що працюють під надлишковим тиском, допуск до яких мають тільки спеціально навчені, сертифіковані співробітники.

Для захисту співробітників від шкідливих факторів виробництва передбачається:

- Наявність витяжних шаф і витяжок для зменшення концентрації шкідливих летких речовин нижче рівня ГДК в при роботі з ними.
- Технологічний одяг і засоби індивідуального захисту використання яких регламентоване в виробничих інструкціях.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						99
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Наявність детальних інструкцій екстрених дій в аварійних ситуаціях з можливим витоком потенційно-інфекційних речовин, чи речовин що шкідливі для здоров'я.

- Наявність аптечок першої медичної допомоги і вогнегасників на місцях.

- Заземлення або занулення всіх електричних приладів.

- Регулярні перевірки справності обладнання. Несправне обладнання використовувати суворо заборонено.

- Наявність звукозахисної ізоляції підприємства в цілому і окремих цехів в яких передбачається підвищений рівень шуму.

- Посадові інструкції розроблені таким чином, що кожного працівника контролює інший працівник, і кожен працівник контролює іншого працівника для запобігання допущення помилок, аварійних ситуацій і відповідно зменшення психологічного навантаження на працівника.

Підприємство забезпечено протипожежною системою, можливе централізоване вимкнення вентиляційних установок у разі пожежі.

Приміщення проектуються з урахуванням ризиків виникнення пожежі, пожежі, вибуху:

- Приміщення в яких передбачається висока пожежна небезпека розділені протипожежними перегородками та протипожежними дверима.

- Шляхи евакуації персоналу обладнанні протидимовими та протипожежними перегородками. На шляхах евакуації розміщенні ніші з пожежними кранами і пожежними рукавами.

- Електропроводка захищена додатковим вогнетривким шаром.

- Довжина евакуаційних шляхів та ширина дверей відповідає СНиП 02.0102-85 «Протипожежні норми».

Охорона природнього середовища.

Атмосферне забруднення яке здійснює це підприємство є досить незначним. Найбільш токсичні з них наведені в таблиці 5.4.1

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						100
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 5.4.1 Шкідливі речовини, що забруднюють повітря в робочій зоні
і в атмосфері.

Речовина	ГДК мг/м ³			Посилання
	В повітрі робочої зони	В атмосфері населених місць		
		максимальна разова	середньодо бова	
Спирт етиловий	10,00	5	5	ГОСТ 12.1.005- 88 ДСП-201-97
Хлороводень	5,00	0,2	0,2	ГОСТ 12.1.005-88
Акриламід	0,2	0,03	0,03	ГОСТ 12.1.005-88 ДСП-201-97
2- меркаптоетанол	0,07	0,07	0,07	ГОСТ 12.1.005-88 ДСП-201-97
Тимеросал	0,005	0,003	0,003	ГОСТ 12.1.005-88 ДСП-201-97

Кількість виробничих стоків за добу становить 20м³. В стоках контролюється кількість токсичних речовин, їх кількість не перевищує ГДК для скидання в міську каналізацію[62-64].

Висновки

1. В даному дипломному проекті для виробництва рекомбінантного білку р24 було обрано продуцент *Escherichia coli Rosetta(DE)pLysS* який має біосинтетичну активність 16 мкг/см^3 цільового білка-антигена. Даний продуцент має вдосконалити технологію, адже має захист від спонтанної індукції, яка може значно зменшити вихід цільового рекомбінантного білка.

2. Проаналізовано шляхи отримання промислових штамів-продуцентів та запропоновано отримання продуценту шляхом трансформації комбінованим методом хімічної індукції трансформації та електропорації клітин з використанням вектору рЕТ-15b-р24.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *Escherichia coli Rosetta(DE)pLysS* було запропоновано використання поживного середовища Н15 модифікованого з додаванням солей MgSO_4 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 та оптимальною кількістю глюкози. Оптимізовано параметри проведення культивування температура $36 \pm 1^\circ\text{C}$, перемішування при 120 об/хв, тривалість 8-12 год, аерація 7 л/хв.

4. Запропоновано зменшити концентрацію ІПТГ для проведення індукції до 0,3мМ, для встановлення оптимального балансу між кількістю біомаси, та кількістю токсичного для клітини цільового білка на клітину.

5. Розроблено стратегію виділення та очистки цільового рекомбінантного білка р24 з клітин продуцента.

6. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва рекомбінантного білка р24 у вигляді розчину для подальшого збуту або ж

					ДП 6203. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Власенко Д.В.				Д	102	110
Консульт.								
Керівник		Литвинов Г.С.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

використання у виробництві моноклональних антитіл, тест систем.

7. Вибрано ферментер об'ємом 160 дм³ з еліптичним днищем, пласкою кришкою, рубашкою, барботером, турбінною мішалкою та зроблено необхідні розрахунки, для підтвердження надійності та працездатності конструкції.

					ДП 6203. 00.000 ПЗ	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		